

# **Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen mitochondrialer Morphologie, Alterung und Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae***

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

– Doktor der Naturwissenschaften –

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

Vorgelegt von

**Mark Dürr**

Bayreuth 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis Juni 2010 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Benedikt Westermann angefertigt.

Vollständiger Ausdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.).

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Stephan Clemens
Tag des Einreichens der Dissertation:	25. Juni 2010
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums:	13. Dezember 2010

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Benedikt Westermann	(Erstgutachter)
PD Dr. Stefan Heidmann	(Zweitgutachter)

*Für*

*Elias*

## **Danksagung**

Ich danke...

...meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann für die Vergabe des Themas sowie für seine hervorragende fachliche und persönliche Unterstützung und Betreuung.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

...meinen Mädels Miriam „Miri“ Hammermeister, Katrin Altmann und Sandra „Sandy“ Merz für die tolle Zusammenarbeit als Team, Eure Unterstützung und den vielen Spaß. Ich danke auch Yvonne Brede und Friederike Mietzsch für die hervorragende Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit. Natürlich danke ich auch allen anderen ehemaligen und noch tätigen Laborkollegen, Bachelor Studenten, Diplomanden und Doktoranden für die fachliche und moralische Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

...Rita Grotjahn für die geduldige Einweisung in die Techniken der Elektronenmikroskopie und die vielen freundschaftlichen Gespräche. Mein Dank gilt auch Annette Suske für die gute Zusammenarbeit und für die vielen hilfreichen Tipps des täglichen Lebens. Außerdem danke ich Petra Helies, die durch Ihren Einsatz immer dafür sorgte, dass der Laboralltag reibungslos verlief und dabei nie den Spaß zu kurz kommen ließ.

...meinen Studienkollegen Jochen Carlo Kaufmann, Stefan (Paul) Gilch, Norbert Rigo, Benjamin (Puffel) Neuhäuser, Michael (Ulle) Grote, Stefan (Ringl) Ringlstetter, Miriam (Miri) Hammermeister, Ulrike (Ulli) Grosskinski und Barbara (Babbele) Herkert für die fantastische Studienzeit, den vielen Spaß und all die tollen Erlebnisse.

...meinen Eltern Ursula und Helmut Dürr für ihre Geduld und Unterstützung, welche mir das Studium erst ermöglichten. Außerdem danke ich ihnen dafür, dass sie mir immer den richtigen Weg im Leben aufzeigten. Ohne Ihr Vorbild wäre ich nicht da wo ich jetzt bin.

...meiner Frau Alexandra, die mir durch viel Geduld, Liebe und Unterstützung stets den Rücken frei hielt.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>IIX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>IX</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mitochondrien .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Funktion und Ursprung .....	1
1.1.2 Die mitochondriale DNA .....	1
1.1.3 Morphologie und Dynamik .....	2
1.1.4 Die mitochondriale Teilung in Hefe.....	3
1.1.5 Fusion von Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i> .....	4
<b>1.2 Der Zusammenhang zwischen Alterung und mitochondrialer Morphologie.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Der programmierte Zelltod .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Apoptose und Alterung .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Zusammenhang zwischen Alterung und Autophagozytose .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Zielsetzung.....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	14
2.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	14
2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten .....	16
2.1.3.1 Restriktionsverdau .....	16
2.1.3.2 Dephosphorylierung .....	16
2.1.3.3 Ligation.....	16
2.1.4 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	16
2.1.5 Plasmidreinigung aus <i>E. coli</i> .....	17
2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	17
2.1.7 Verwendete Plasmide .....	18
<b>2.2 Methoden der Hefegenetik .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.2.2 Herstellung diploider Zellen .....	20
2.2.3 Herstellung von Doppelmutanten.....	20
2.2.4 Transformation von Hefe .....	21
2.2.5 Verwendete Hefestämme .....	21

<b>2.3 Methoden der Zellbiologie .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> (Drop-Dilution Test) .....	22
2.3.2 Wachstumsanalyse mittels OD <sub>600</sub> -Messung.....	22
2.3.3 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	22
2.3.4 DAPI-Färbung der mtDNA .....	23
2.3.5 Calcofluorfärbung der Zellwand.....	24
2.3.6 Rhodamin-Färbung der Mitochondrien .....	24
2.3.7 Rhodamin-Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts .....	24
2.3.8 Identifizierung von ROS durch Färbung mit Dihydrorhodamin-123 (DHR) .....	25
2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.3.10 Aufreinigung replikativ gealterter Hefezellen.....	25
2.3.10.1 Markierung der Zellen mit Biotin.....	26
2.3.10.2 Trennung von Mutter- und Tochterzellen .....	26
2.3.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	27
2.3.11.1 Kontrastierung der Zellen .....	27
2.3.11.2 Entwässerung und „Critical-Point-Drying“ .....	27
2.3.11.3 Mikroskopie .....	27
2.3.12 Transmissions-Elektronenmikroskopie .....	27
2.3.12.1 Präparation von isolierten Mitochondrien .....	27
2.3.12.2 Präparation von Hefezellen .....	28
2.3.12.3 Herstellung von Ultradünnschnitten .....	29
2.3.12.4 Mikroskopie .....	29
2.3.12.5 3D-Rekonstruktion von Mitochondrien .....	29
<b>2.4 Methoden der Proteinbiochemie .....</b>	<b>30</b>
2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.4.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot) .....	30
2.4.3 Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion .....	30
2.4.4 <i>In vivo</i> Translation mitochondrial codierter Proteine .....	31
2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	32
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Die mitochondrialen F-Box Proteine Mfb1 und Mdm30 regulieren die mitochondriale Morphologie in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Mfb1 ist ein mitochondrial lokalisiertes F-Box Protein .....	33
3.1.2 Die Deletion von <i>MFB1</i> bzw. <i>MDM30</i> führt zu einem mitochondrialen Morphologiedefekt .....	34

3.1.3	Das F-Box Motiv ist nicht essentiell für die Funktion von Mfb1 und Mdm30 .....	39
3.1.4	Mfb1 und Mdm30 sind die einzigen F-Box Proteine in Hefe, die die mitochondriale Morphologie regulieren.....	40
<b>3.2</b>	<b>Mitochondriale Fusionsdefekte beeinträchtigen die Zelldifferenzierung in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Die Deletion von <i>MFB1</i> und <i>MDM30</i> führt zu Wachstumsdefekten .....	43
3.2.2	Die Blockierung der mitochondrialen Fusion stört die Sporulation und die Vererbung von Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i> .....	44
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zum programmierten Zelltod in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Die Behandlung mit Bax hat keine Auswirkungen auf die Integrität von Mitochondrien .....	48
3.3.2	Apoptose bewirkt einen langfristigen Wachstumsvorteil für Hefekulturen .....	50
<b>3.4</b>	<b>Nährstoffmangel führt in Fusionsmutanten zu einem Wachstumsdefekt und zur Aktivierung des programmierten Zelltodes .....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Das Wiederwachstum von hungernden Fusionsmutanten ist beeinträchtigt .....	57
3.4.2	Fusionsmutanten aktivieren bei Nährstoffmangel das apoptotische Programm .....	58
<b>3.5</b>	<b>Die mitochondriale Dynamik beeinflusst die replikative Alterung in <i>S. cerevisiae</i> ....</b>	<b>60</b>
3.5.1	Die $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante besitzt ein wildtypisches mitochondriales Netzwerk.....	60
3.5.2	Replikativ gealterte Zellen mit mitochondrialem Morphologiedefekt haben ein verzögertes Wachstum .....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>68</b>
4.1	Mfb1 ist mitochondrial lokalisiert und reguliert die mitochondriale Morphologie ...	68
4.2	Die Deletion von <i>MDM30</i> führt zur Bildung von mitochondrialen Fusionsintermediaten .....	69
4.3	Die mitochondriale Fusion ist wichtig für die Sporulation in <i>S. cerevisiae</i> .....	70
4.4	Das langfristige Überleben einer Hefekultur ist abhängig vom programmierten Zelltod .....	71
4.5	Die mitochondriale Fusion ist entscheidend für das Überleben unter Nährstoffmangel.....	73
4.6	Die mitochondriale Dynamik ist wichtig für die korrekte Vererbung der mtDNA .....	74
4.7	Dynamik und Funktion der Mitochondrien sind entscheidend für die replikative Alterung von Hefezellen.....	75
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>90</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>96</b>
	<b>ERKLÄRUNGEN.....</b>	<b>97</b>

## ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CfU	Colony forming Units
C <sub>T</sub> -Wert	Schwellenwert; definiert den Anfang der exponentiellen Phase bei der DNA-Amplifikation
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin-123
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DOX	Doxycyclin
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G418	Geneticin-Disulfat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IMS	Intermembranraum
mtDNA	Mitochondriale DNA
mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und einer mitochondrialen Präsequenz
mtRFP	Fusionsprotein aus RFP und einer mitochondrialen Präsequenz
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p.a.	<i>pro analysis</i> ; für die Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	Quantitative PCR
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
rho <sup>0</sup>	kompletter Verlust der mtDNA
rho <sup>+</sup>	intakte (wildtypische) mtDNA
rho <sup>-</sup>	mutierte oder teilweise deletierte mtDNA
SCD/SCG/SCGal/SCRaf	Minimalmedium mit Zusatz aller nicht für die Selektion notwendigen Aminosäuren und mit Glukose, Glycerin, Galaktose oder Raffinose als Kohlenstoffquelle
SD/SGal	Minimalselektivmedium mit Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt von Oligonukleotiden
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
YPD/YPG/YPGal	Hefenährmedium aus Hefeextrakt und Pepton mit Glukose, Glycerin oder Galaktose als Kohlenstoffquelle

## ZUSAMMENFASSUNG

Mitochondrien üben viele essentielle Funktionen in eukaryotischen Organismen aus. Ihre Aufgaben bestehen zum Beispiel in der Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch die oxidative Phosphorylierung sowie in der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern. Mitochondrien bilden ein Netzwerk, dessen Form sich hochdynamisch an spezifische Bedingungen und Änderungen im Metabolismus anpassen kann. Die Bedeutung einer intakten Dynamik wird dann offensichtlich, wenn man die Auswirkungen der Fehlregulierung dieses Prozesses betrachtet. Die Störung der mitochondrialen Fusion geht in Säugern mit einer Reihe von schweren Erkrankungen, wie Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A oder Dominanter Optischer Atrophie einher. Zudem spielen Mitochondrien und die mitochondriale Dynamik eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose). Die Fragmentierung der Mitochondrien ist dabei ein entscheidender Schritt beim Ablauf dieses Prozesses. Auch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einem fakultativ anaeroben eukaryotischen Organismus, spielen mitochondriale Teilung und Fusion eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Bis heute sind jedoch kaum negative Auswirkungen fehlgesteuerter mitochondrialer Dynamik auf andere Prozesse wie Zelldifferenzierung oder Alterung in Hefezellen bekannt.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von gestörter mitochondrialer Teilung und Fusion auf die Sporulation von Hefezellen sowie auf deren Lebensdauer untersucht. Dabei wurde auch der Zusammenhang zwischen Apoptose und Zellalterung in Hefekulturen näher betrachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Deletion von Mdm30 (mitochondrial distribution und morphology protein 30), einem Regulator des mitochondrialen Fusionsproteins Fzo1 (fuzzy onions homolog 1), zu einer eingeschränkten Sporulationseffizienz sowie zu mitochondrialen Vererbungsdefekten in den einzelnen Sporen führt. Des Weiteren zeigten die Untersuchungen, dass eine intakte mitochondriale Dynamik ausschlaggebend für die Alterung von Hefekulturen ist. Die gleichzeitige Blockade der mitochondrialen Fusion und Teilung durch Deletion der Fusionskomponente Fzo1 und des mitochondrialen Teilungsproteins Dnm1 (dynamin-related protein 1) hat negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Fitness der Hefekulturen. Der mitochondriale Fusionsdefekt führt zudem zu einer stark herabgesetzten chronologischen Lebensdauer verbunden mit verstärkter Apoptose der Hefezellen. Eine direkte Blockade der Apoptose durch die Deletion des

proapoptotischen Faktors Yca1 (yeast caspase 1) führt ebenfalls zu einer Reduktion der chronologischen Lebensdauer von Hefekulturen. Interessanterweise verlängert die gleichzeitige Inkubation der Mutante mit wildtypischen Zellen die Lebensdauer der  $\Delta yca1$ -Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Hefekulturen vom programmierten Zelltod einzelner Zellen profitieren können, was zu einer Verlängerung der chronologischen Lebensspanne führt. Obwohl Sinn und Nutzen des programmierten Zelltodes für *S. cerevisiae* immer noch kontrovers diskutiert werden, liefern die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse weitere Argumente für die Notwendigkeit der Apoptose für diese einzelligen Organismen.

## SUMMARY

Mitochondria are an important part of many metabolic processes such as the supply of energy by oxidative phosphorylation or the production of iron-sulfur-clusters, which is an essential process for every eukaryotic organism. In addition they play a central role in the pathway of programmed cell death (apoptosis). Mitochondria build a network which is highly dynamic and can be adjusted to specific conditions and changes in metabolism. For this, a permanent fusion and division of these organelles is essential. The importance of an intact machinery of mitochondrial dynamics becomes obvious when the consequences of mis-regulation of this process are regarded. Defects in mitochondrial fusion lead to several severe diseases like Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A or Dominant Optic Atrophy. Furthermore, mitochondria and their dynamics play a central role during programmed cell death. In this process mitochondrial fragmentation is an important step. In baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a facultative anaerobic eukaryotic organism, mitochondrial dynamics are crucial for apoptosis, as well. However, only little is known about the effects of mis-regulated mitochondrial fusion and fission on other processes like cell differentiation or aging.

In this work the impact of impaired mitochondrial fusion and division on sporulation as well as on the lifespan of yeast cells was investigated. In addition the relation between apoptosis and aging in yeast cell-cultures was studied in more detail. The data show that mitochondrial fusion is important for sporulation of yeast cells. Deletion of Mdm30 (mitochondrial distribution and morphology protein 30), a regulator of the mitochondrial fusion protein Fzo1 (fuzzy onions homolog 1), leads to impaired sporulation as well as to an inheritance defect for mitochondria in spores. It could also be shown that an intact and dynamic mitochondrial network is important during aging of yeast cultures. The inhibition of both mitochondrial fusion and division by deletion of the fusion-component Fzo1 and the division-protein Dnm1 (dynamin-related protein 1) negatively affects growth and fitness of yeast cultures. Defective mitochondrial fusion leads to a severe decrease of the chronological lifespan of yeast cells combined with increased apoptosis. Direct inhibition of programmed cell death by deletion of the pro-apoptotic factor Yca1 (yeast caspase 1) causes a reduction of the chronological lifespan of yeast cultures, as well. Incubation together with wild-type cells, however, increases the lifespan of the mutant. This leads to the assumption

that yeast cultures are able to benefit from apoptosis of single cells, which positively affects the chronological lifespan of the whole culture. Although meaning and benefit of programmed cell death for *S. cerevisiae* are still discussed controversially, the results in this work deliver more arguments for the advantage of apoptosis for this unicellular organism.



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Mitochondrien

#### 1.1.1 Funktion und Ursprung

Mitochondrien sind Organellen, die eine Reihe wichtiger Funktionen in eukaryotischen Zellen wahrnehmen. Zu ihren Aufgaben gehören neben der Erzeugung von Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung (Saraste, 1999) auch die essentielle Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern (Lill und Muhlenhoff, 2005). Außerdem spielen sie eine bedeutende Rolle beim programmierten Zelltod (Desagher und Martinou, 2000; Youle und Karbowski, 2005).

Mitochondrien sind prokaryotischen Ursprungs. Vermutlich entstanden sie durch die Aufnahme eines  $\alpha$ -Proteobakteriums in eine eukaryotische oder archaebakterielle Zelle (Gray *et al.*, 1999; Wallace, 2005). Durch unvollständige Phagozytose wurde das Bakterium von der Plasmamembran der Wirtszelle umschlossen, was zur Bildung einer doppelten Membran führte. Aufgrund ihrer Doppelmembran werden Mitochondrien in vier Kompartimente unterteilt: Die äußere Membran, der Intermembranraum, die innere Membran und die Matrix. Durch diese Kompartimentierung können Reaktionen und Moleküle räumlich voneinander getrennt und wichtige Funktionen wie der programmierte Zelltod gezielt reguliert werden.

#### 1.1.2 Die mitochondriale DNA

Wegen ihrer prokaryotischen Herkunft besitzen Mitochondrien eine eigene mitochondriale DNA (mtDNA). Die meisten mitochondrialen Gene sind jedoch im Laufe der Evolution in den Zellkern der eukaryotischen Zelle gewandert. Daher codiert die mtDNA je nach Organismus nur noch für einige ribosomale Proteine, tRNAs und Untereinheiten der Atmungskette. Die kerncodierten mitochondrialen Proteine werden im Cytosol gebildet und mittels einer Präsequenz in die Mitochondrien transportiert. Die Anzahl an mtDNA Molekülen ist reguliert und beträgt in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ca. 20-50 (Hall *et al.*, 1976), wobei mehrere Moleküle ein Nukleoid bilden, das an der mitochondrialen Innenmembran verankert ist (Dimmer *et al.*, 2005). Aufgrund der Fähigkeit von Hefe, fakultativ anaerob zu wachsen, ist die mtDNA in diesem Organismus nicht essentiell. Jedoch führen Mutationen oder Verlust

der mtDNA zu respiratorischer Inkompetenz, wodurch die Zellen nicht mehr in der Lage sind, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen (Okamoto und Shaw, 2005).

### **1.1.3 Morphologie und Dynamik**

In den meisten Organismen bilden Mitochondrien lange Schläuche, die verzweigt sind (Hoffmann und Avers, 1973; Nunnari *et al.*, 1997). Die Organellen sind sehr dynamisch und durchlaufen ständige Fusions- und Teilungsprozesse (Bereiter-Hahn, 1990; Okamoto und Shaw, 2005). Die Dynamik der Organellen sowie ihre ständige Bewegung sind wichtig für ihre Funktionen bei unterschiedlichsten Prozessen. Dazu zählen Spermatogenese (Honda und Hirose, 2003), Übermittlung von Calciumsignalen (Szabadkai *et al.*, 2006), Apoptose (Heath-Engel und Shore, 2006; Parone und Martinou, 2006) sowie Alterung (Sato *et al.*, 2006). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bilden die Mitochondrien ebenfalls ein verzweigtes Netzwerk aus, wobei die Morphologie je nach Wachstumsphase, Nährstoffangebot oder Zellstadium variieren kann. Beim Wechsel von Wachstum auf fermentativen Kohlenstoffquellen hin zu Wachstum auf nicht-fermentativen Kohlenstoffquellen erhöht sich die Masse der Organellen, und die Anzahl der Verzweigungen nimmt stark zu (Visser *et al.*, 1995; Egner *et al.*, 2002). In der stationären Phase (die Zellen bilden keine Knospen) liegen die Mitochondrien dagegen als kleine Fragmente vor (Stevens, 1981). Während der Sporulation (diploide Hefezellen bilden unter bestimmten Bedingungen haploide Sporen) wechseln die Organellen sogar mehrere Male zwischen Netzwerk und Fragmenten (Gorsich und Shaw, 2004; Dürr *et al.*, 2006).

Die hohe Dynamik der Mitochondrien erfordert ein reguliertes Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsprozessen. Bei blockierter mitochondrialer Teilung bildet sich aufgrund der weiterhin stattfindenden Fusionsprozesse ein engmaschiges mitochondriales Netz aus (Merz *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu führt die Deletion von Fusionskomponenten zur Fragmentierung der Mitochondrien (Merz *et al.*, 2007). Die gestörte Fusionsfähigkeit der Mitochondrien bewirkt in Hefe außerdem den Verlust mitochondrialer DNA und damit einen respiratorischen Wachstumsdefekt, was die Bedeutung einer ausgeglichenen mitochondrialen Morphologie widerspiegelt (Chen und Butow, 2005; Merz *et al.*, 2007). In höheren Organismen (wie z.B. Säugern) haben Fusions- und Teilungsdefekte sogar noch gravierendere Auswirkungen auf die Zellen und den gesamten Organismus. Beispielsweise stehen Fusionsdefekte im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie der

Dominanten Optischen Atrophie und Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2006). Die mitochondriale Fusion ist wichtig für viele verschiedene zelluläre Prozesse, wie der Bildung von Spermien in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Hales und Fuller, 1997) oder der Embryonalentwicklung in Mäusen (Chen *et al.*, 2003). Die mitochondriale Teilung hingegen spielt eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Fannjiang *et al.*, 2004; Jagasia *et al.*, 2005; Youle und Karbowski, 2005).

#### **1.1.4 Die mitochondriale Teilung in Hefe**

In Hefe erfolgt die Teilung der Mitochondrien durch die Proteine Fis1 (mitochondrial fission protein 1), Dnm1, Mdv1 (mitochondrial division protein 1) und Caf4 (CCR4 associated factor 4). Mdv1 ist ein cytosolisches Protein, das ein WD-40 Motiv sowie eine coiled-coil Struktur besitzt. Es bindet zusammen mit Dnm1, einer Dynamin-verwandten GTPase, an Fis1 auf der mitochondrialen Oberfläche. Bei diesem Vorgang bilden mehrere Dnm1-Moleküle vermutlich einen Ring, der zur Einschnürung und schließlich zur Durchtrennung des Mitochondrions führt (Ingelman *et al.*, 2005; Merz *et al.*, 2007). Caf4, ein Protein mit WD-40 Motiv, ist ebenfalls an der Teilung der Mitochondrien beteiligt. Seine strukturelle Ähnlichkeit zu Mdv1 und die Tatsache, dass bei gleichzeitiger Deletion des Gens *CAF4* der Effekt der *MDV1*-Deletion verstärkt wird, deutet auf eine redundante Funktion beider Proteine hin (Griffin *et al.*, 2005). Caf4 und Mdv1 wurden bis dato nur in Hefe identifiziert, wohingegen in anderen Spezies, wie Säugern, Homologe zu Dnm1 und Fis1 gefunden wurden (Okamoto und Shaw, 2005).

Bis heute ist unklar, ob die Teilung der mitochondrialen Außenmembran und der Innenmembran gemeinsam (evtl. durch die Einschnürung der Mitochondrien durch Dnm1) oder getrennt ablaufen. In *S. cerevisiae* wurde das Protein Mdm33 (mitochondrial distribution und morphology protein 33) identifiziert, ein integrales Innenmembranprotein, das coiled-coil Domänen besitzt, welche in die Matrix ragen. Die Deletion des Gens *MDM33* führt zur Ausbildung von stark vergrößerten, ringartigen Mitochondrien. Dagegen bewirkt die Überexpression des Gens eine Septenbildung innerhalb der Organellen. Somit könnte Mdm33 spezifisch für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran verantwortlich sein (Messerschmitt *et al.*, 2003).

### **1.1.5 Fusion von Mitochondrien in *S. cerevisiae***

Die mitochondriale Fusion in Hefe erfolgt durch das Zusammenspiel der Proteine Fzo1, Ugo1 (UGO, japanisch für Fusion) und Mgm1 (mitochondrial genome maintenance protein 1) in einem Fusionskomplex. Fzo1 ist eine 98 kDa große, in die mitochondriale Außenmembran integrierte GTPase (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Das Protein besitzt coiled-coil Domänen, die in das Cytosol ragen. Vermutlich dienen diese Strukturen der Interaktion von Fzo1-Molekülen zweier Mitochondrien bei der Fusion (Rojo *et al.*, 2002; Koshiba *et al.*, 2004). In den Intermembranraum ragt ein Loop, der die beiden Transmembrandomänen verbindet und wichtig für die Ausbildung des Fusionskomplexes ist (Fritz *et al.*, 2001). Mgm1, eine Dynamin-verwandte GTPase, ist in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert und ragt in den Intermembranraum (Wong *et al.*, 2000). Das Protein bildet Homooligomere und vermittelt dadurch vermutlich während des Fusionsprozesses die Innenmembranfusion (Wong *et al.*, 2003). Mgm1 liegt in zwei Isoformen vor: Die lange l-Isoform ist mit dem N-Terminus in der Innenmembran integriert, die kurze s-Isoform liegt dagegen als lösliches Protein im Intermembranraum vor. Beide Isoformen sind wichtig für die mitochondriale Fusion, da die Deletion jeder der beiden Formen *in vivo* zur Fragmentierung der Mitochondrien führt (Herlan *et al.*, 2003). Vermutlich dient die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen beiden Isoformen dazu, die mitochondriale Fusion an die Bedürfnisse der Zelle anzupassen (Herlan *et al.*, 2004). *In vitro* Untersuchungen zur mitochondrialen Fusion konnten die direkte Beteiligung von Mgm1 an der mitochondrialen Innenmembranfusion zeigen (Meeusen *et al.*, 2006). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Fusion der Außenmembran und die der Innenmembran getrennt voneinander ablaufen (Meeusen *et al.*, 2004). Das dritte Protein des Fusionskomplexes, Ugo1, konnte bis heute nur in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Ugo1 ist in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert und besitzt mehrere Transmembrandomänen (Coonrod *et al.*, 2007). Vermutlich funktioniert das Protein als Adapter zwischen Fzo1 und Mgm1 und vermittelt dabei die Interaktion der beiden Proteine bei der mitochondrialen Fusion (Sesaki und Jensen, 2004).

Bis heute konnten drei Proteine identifiziert werden, die direkt an der Regulation der mitochondrialen Fusion beteiligt sind. Pcp1 (processing of cytochrom c peroxidase protein 1) und Ups1 (unprocessed 1) sind für die Prozessierung von Mgm1 verantwortlich (Herlan *et al.*, 2004, Sesaki *et al.*, 2003), wohingegen das Protein Mdm30 den Turn-over von Fzo1

reguliert (Fritz *et al.*, 2003). Pcp1, ein Mitglied der Rhomboid-verwandten Proteasen, trennt den membranständigen N-terminalen Teil von Mgm1 ab, wodurch die kurze, lösliche s-Isoform des Proteins entsteht (McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003; Herlan *et al.*, 2004). Ups1 ist im Intermembranraum lokalisiert und reguliert die Pcp1-abhängige Prozessierung von Mgm1 während dem Import des Teilungsproteins in die Mitochondrien. Allerdings ist Ups1 nur bei Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen notwendig, was darauf schließen lässt, dass das Protein die Anpassung der mitochondrialen Morphologie an die metabolischen Aktivitäten der Zelle reguliert (Sesaki *et al.*, 2006). Mdm30 ist ein mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiertes F-Box Protein. Proteine der F-Box Familie sind häufig Untereinheiten von Skp1-Cullin-F-Box (SCF) Ubiquitin Ligasen, die viele zelluläre Prozesse regulieren und unter anderem den proteasomalen Abbau von Proteinen vermitteln (Petroski und Deshaies, 2005). Cohen *et al.* (2008) konnten zeigen, dass der durch Mdm30 vermittelte Abbau von Fzo1 tatsächlich mittels Ubiquitinierung und Verdau im 26S Proteasom erfolgt. Auch der Abbau von Fzo1 in Zellen, die mit  $\alpha$ -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert wurden, ist abhängig vom 26S Proteasom. Allerdings wird der Prozess in diesem Fall nicht von Mdm30 reguliert (Neutzner und Youle, 2005; Escobar-Henriques *et al.*, 2006). Die Deletion des Gens *MDM30* führt zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien, da vermutlich durch den langsameren Turn-over von Fzo1 inaktive Fzo1-Komplexe gebildet werden, welche die mitochondriale Fusion inhibieren (Fritz *et al.*, 2003; Dürr *et al.*, 2006).

Mfb1 (mitochondria-associated f-box protein 1) ist ein weiteres, mitochondrial lokalisiertes Protein, dessen Deletion zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien führt. Das 53 kDa große Protein besitzt wie Mdm30 ein F-Box Motiv am N-Terminus (Dürr *et al.*, 2006). Eine Studie zur Identifikation von Proteinkomplexen mittels Massenspektrometrie zeigte eine Interaktion von Mfb1 mit Skp1 – einer Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Ho *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass Mfb1 neben Mdm30 eventuell am Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau beteiligt ist. Eine weitere Studie zur subzellulären Lokalisation des Hefeproteoms mittels GFP-Fusionsproteinen deutete auf eine mitochondriale Lokalisation von Mfb1 hin (Huh *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Mfb1 in einem bis dato noch unbekannten regulativen Signalweg für die Morphologie der Mitochondrien verantwortlich ist. Nähere Untersuchungen zur Funktion von Mfb1 und Mdm30 wurden in dieser Arbeit durchgeführt.

## 1.2 Der Zusammenhang zwischen Alterung und mitochondrialer Morphologie

In *S. cerevisiae* unterscheidet man zwischen zwei Typen der Zellalterung – der replikativen und der chronologischen Alterung. Die replikative Lebensspanne ist definiert durch die maximale Anzahl an Knospen, die eine Mutterzelle produzieren kann, bevor sie stirbt. Die chronologische Lebensspanne hingegen bestimmt den Zeitraum, den Hefezellen in stationärer Phase, also ohne sich zu teilen, überleben können. Diese beiden Alterungsformen spiegeln die Alterung von proliferierenden Zellen und nicht-proliferierenden Zellen wie postmitotischem Gewebe wider. Mit der Bäckerhefe steht somit ein ideales Werkzeug zur Studie dieser Alterungsprozesse in einem leicht zu kultivierenden einzelligen Organismus zur Verfügung (Kaeberlein *et al.*, 2007). In verschiedenen Untersuchungen konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Lebensdauer von Hefezellen haben. Beispielsweise führt eine Reduktion der Kalorienzufuhr sowohl zu einer Verlängerung der replikativen als auch der chronologischen Lebensspanne (Jiang *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Fabrizio *et al.*, 2003; Reverter-Branchat *et al.*, 2004; Fabrizio *et al.*, 2005). Auch in anderen Organismen wie Würmern, Fliegen und Nagern bewirkt eine Limitierung der Kalorienzufuhr eine Erhöhung der Lebensspanne (Weindruch, 1996; Masoro, 2005).

Generell führt Alterung zur Abnahme mitochondrialer Funktionen, wie der oxidativen Phosphorylierung. Zudem steigt mit zunehmendem Alter die Anzahl an Mutationen in der mtDNA, es bilden sich anormale mitochondriale Cristaestrukturen und die Konzentration an freien Radikalen steigt (Lenaz, 1998). Die Fusion von Mitochondrien kann hingegen mtDNA Mutationen komplementieren (Nakada *et al.*, 2001) und könnte somit als Schutz gegen Alterung dienen. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass eine Blockade der mitochondrialen Teilung in *S. cerevisiae* durch Deletion des mitochondrialen Teilungsproteins Dnm1 die Lebensdauer und Fitness der Zellen erhöht. Gleichzeitig waren die Zellen resistenter gegen die Aktivierung des programmierten Zelltodes, was auf einen engen Zusammenhang zwischen Alterung, mitochondrialer Dynamik und Apoptose schließen lässt (Scheckhuber *et al.*, 2007).

### 1.3 Der programmierte Zelltod

Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus zur Beseitigung beschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen in Metazoen. Dabei profitiert der gesamte Organismus vom Tod einzelner Zellen, z.B. bei der Embryogenese oder der Bildung von Geweben (Parone und Martinou, 2006). Obwohl dieser Mechanismus in einzelligen Organismen wie *S. cerevisiae* ebenfalls nachgewiesen werden konnte, sind Sinn und Nutzen in diesem Fall umstritten (Büttner *et al.*, 2006). In Hefe konnten verschiedene typische Apoptosemarker identifiziert werden. Dazu gehören die Externalisierung von Phosphatidylserin, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Madeo *et al.*, 1997). Außerdem erfolgt in Hefe ebenfalls eine Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien (Madeo *et al.*, 1997; Ludovico *et al.*, 2002). Zudem fragmentieren die Mitochondrien und verlieren ihr Membranpotential (Pozniakovsky *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Apoptose in Hefe durch die Expression von Bax, einem proapoptotischen Faktor aus Säugern, induziert werden kann (Pavlov *et al.*, 2001).

Eine zentrale, evolutionär konservierte Rolle beim programmierten Zelltod spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Stark erhöhte ROS Konzentrationen der Zelle führen zur Ausbildung typischer apoptotischer Marker, zur Freisetzung von Cytochrom *c* sowie zur Aktivierung proapoptotischer Caspasen, zentraler Komponenten des programmierten Zelltodes (Schulz *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 1999; Madeo *et al.*, 2004). In den letzten Jahren wurde auch in Hefe eine Reihe apoptotischer Regulatoren identifiziert. Dazu gehören die Hefecaspase Yca1 sowie der Apoptose-induzierende Faktor Aif1 (apoptosis-inducing factor 1). Beide sind Komponenten des ROS-induzierten programmierten Zelltodes (Madeo *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2004; Madeo *et al.*, 2009). Weitere Faktoren sind die apoptotische Serinprotease Nma111 (nuclear mediator of apoptosis 111) (Fahrenkrog *et al.*, 2004), deren antiapoptotisches Substrat Bir1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 1) (Walter *et al.*, 2006), Endonuclease G (Büttner *et al.*, 2007), Ndi1 (NADH dehydrogenase internal 1) (Li *et al.*, 2006) und konservierte proteasomale Signalwege wie der Abbau von Cdc6 (cell division cycle 6) (Ligr *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2002). Yca1 ist ein wichtiger Faktor, der für über 40% der apoptotischen Szenarios in Hefe essentiell ist. Bei der Caspase-unabhängigen Apoptose spielen Aif1 und die Endonuclease G eine zentrale Rolle (Madeo *et al.*, 2009).

Die mitochondriale Morphologie stellt ebenfalls eine wichtige Komponente des programmierten Zelltodes dar, da ein wichtiger Schritt während der Apoptose die Fragmentierung der Mitochondrien ist (Youle und Karbowski, 2005). Interessanterweise führt die Inhibierung von Drp1 (dynamin-related protein 1), dem Säugerhomolog von Dnm1, neben dem Verlust der mitochondrialen Teilungsfähigkeit auch zur Verlangsamung der Caspaseaktivierung und damit des apoptotischen Prozesses in Säugerzellen (Frank *et al.*, 2001; Karbowski *et al.*, 2002; Breckenridge *et al.*, 2003; Sugioka *et al.*, 2004). Auch in *Caenorhabditis elegans* konnte mittlerweile eine Rolle der Mitochondrien bei der Aktivierung von Caspasen beim programmierten Zelltod nachgewiesen werden (Youle und Karbowski, 2005). Neben Drp1 sind auch andere mitochondriale Morphologiekomponenten wichtig für die Apoptose. Die Inhibierung von hFis1, dem Säugerhomolog von Fis1 aus Hefe, blockiert ebenfalls den programmierten Zelltod in Säugerzellen (Lee *et al.*, 2004), wohingegen die Überexpression von hFis1 die Apoptose aktiviert (James *et al.*, 2003). Die mitochondrialen Fusionskomponenten haben die entgegengesetzte Funktion. Zum einen verhindert die Überexpression von Fzo1A/B (Homologe des Hefeproteins Fzo1) in Rattenzellen die Apoptose. Gleichzeitig führt die Inhibierung der Expression von Fzo1A/B sowie von Mfn1/2 (mitofusin-1/2; Homologe von Fzo1 aus *Homo sapiens*) zur Fragmentierung von Mitochondrien und zur Aktivierung des programmierten Zelltodes in Ratten- bzw. in humanen Zellen (Sugioka *et al.*, 2004). Die Inhibierung der Expression von Opa1 (optic atrophy 1), dem Säugerhomolog der mitochondrialen Fusionskomponente Mgm1 aus Hefe, führt zur Fragmentierung der Mitochondrien, der Ausschüttung von Cytochrom c sowie der Aktivierung des programmierten Zelltodes in Säugerzellen (Olichon *et al.*, 2003). In Hefe wirken die mitochondrialen Teilungskomponenten Dnm1 und Mdv1 ebenfalls proapoptotisch. Interessanterweise hat Fis1 in Hefe im Gegensatz zu seinem Säugerhomolog eine antiapoptotische Funktion. Zudem kann es in Hefezellen funktionell durch die humanen antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x ersetzt werden (Fannjiang *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Funktion der Mitochondrien beim programmierten Zelltod hin.



## 1.4 Apoptose und Alterung

Neben ihrer Schlüsselrolle beim programmierten Zelltod haben ROS (reaktive Sauerstoffspezies) auch eine wichtige evolutionär konservierte Funktion bei der Alterung (Schulz *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 1999). ROS akkumulieren in gealterten Zellen (Laun *et al.*, 2007). Zudem zeigen sowohl replikativ als auch chronologisch gealterte Hefezellen neben einer erhöhten ROS-Konzentration auch typische apoptotische Marker wie Externalisierung von Phosphatidylserin an der Plasmamembran, Fragmentierung der DNA und Chromatin-kondensation (Laun *et al.*, 2001; Herker *et al.*, 2004). Zusätzlich weisen gealterte Hefezellen eine erhöhte Caspaseaktivität auf (Herker *et al.*, 2004). Tatsächlich führt die Blockierung des programmierten Zelltodes oder die Beseitigung von ROS zur Verlängerung der Lebensspanne (Fabrizio *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Piper *et al.*, 2006). Zum Beispiel führt die Deletion der Gene *AIF1*, *YCA1*, *NDI1* oder *NMA111* zur Verzögerung der alterungsbedingten Apoptose (Madeo *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2006). Andererseits führt die Überexpression des Gens *YCA1* zur Verkürzung der chronologischen Lebensspanne, wohingegen die Überexpression von *BIR1* die chronologische Lebensspanne in Hefe erhöht (Walter *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen zeigen, dass Apoptose und Alterung sehr eng miteinander verbunden sind.

## 1.5 Zusammenhang zwischen Alterung und Autophagozytose

Autophagozytose oder Autophagie ist ein wichtiger Prozess, bei dem Proteine und Organellen in Lysosomen (bei Hefe- und Pflanzenzellen in der Vakuole) verdaut und die entstandenen Nährstoffe wichtigen Stoffwechselprozessen zur Verfügung gestellt werden (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Dieser Abbau kann zum einen der Beseitigung von beschädigtem Material dienen. Aber auch Nährstoffknappheit kann zur Aktivierung der Autophagozytose führen (Kaeberlein *et al.*, 2007). Man kann drei Prozesse der Autophagie unterscheiden: Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. Bei der Mikroautophagie gelangen cytosolische Bestandteile durch Einstülpung der Vakuolenmembran in die Vakuole und werden anschließend verdaut. Beim Prozess der Makroautophagie können ganze Organellen abgebaut werden, indem sie von sogenannten Autophagosomen umschlossen und zur Vakuole transportiert werden. Chaperon-vermittelte

Autophagie hingegen dient dem selektiven Abbau löslicher cytosolischer Proteine oder spezifischer Substrate (Reggiori und Klionsky, 2002).

Autophagie hat vermutlich auch eine wichtige Funktion bei der Regulation der Alterung. In Ratten nimmt die Autophagie zum Beispiel mit zunehmendem Alter ab (Vittorini *et al.*, 1999; Cuervo und Dice, 2000; Cuervo, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass Autophagozytose für die Verlängerung der Lebensspanne in der *C. elegans* Mutante *daf-2* (abnormal dauer formation 2) notwendig ist (Melendez *et al.*, 2003). In Hefe wird Autophagozytose beim Eintritt in die stationäre Phase aktiviert – vermutlich als Antwort auf Nährstoffknappheit (Kamada *et al.*, 2004). Dementsprechend besitzen einige Autophagiemutanten eine verkürzte chronologische Lebensspanne, da die Nährstoffknappheit vermutlich nicht mehr durch den Verdau von Zellkomponenten kompensiert werden kann (Powers *et al.*, 2006). Eine Verlängerung der chronologischen Lebensspanne kann auch durch Wachstum unter Stickstoffmangel oder durch Behandlung mit Rapamycin hervorgerufen werden, da dadurch die Autophagozytose aktiviert wird (Kamada *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2006).

Einige Aufgaben der Autophagie in alternden Zellen könnten die Beseitigung von oxidativ beschädigten Proteinen, die Verhinderung der Proteinaggregation sowie die Verwertung von beschädigten Mitochondrien sein (Kaeberlein *et al.*, 2007). Twig *et al.* (2008b) konnten zeigen, dass eine Art Qualitätskontrolle existiert, wonach Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential nicht mehr fusionieren, sondern in der Vakuole abgebaut werden. Zudem reduziert die RNAi-vermittelte Verringerung von Fis1 oder die Überexpression der dominant negativen Isoform von Drp1 (nichtfunktionelles Drp1<sup>K38A</sup>) die mitochondriale Autophagie in Säugerzellen (Arnoult *et al.*, 2005; Barsoum *et al.*, 2006; Twig *et al.*, 2008a). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine direkte Verbindung zwischen der mitochondrialen Dynamik und der autophagozytotischen Beseitigung von beschädigten Mitochondrien in alternden Zellen besteht. Die mitochondriale Alterungstheorie verbindet ebenfalls die Alterung mit der Funktion von Mitochondrien. Demnach führt die Akkumulation von ROS mit zunehmendem Alter zur Schädigung von mitochondrialen Proteinen und Membranen sowie von mtDNA, da ROS während der Atmung hauptsächlich in diesen Organellen entstehen. Mutationen der mtDNA können zwar durch Reparaturmechanismen (Doudican *et al.*, 2005), Komplementation bei Fusionsprozessen (Sato *et al.*,

2006) oder durch den Abbau der Organellen in der Vakuole verringert werden (Kaeberlein *et al.*, 2007). Jedoch kann die Zelle nicht verhindern, dass sich solche Schäden mit zunehmendem Alter anhäufen. Dies führt zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien und schließlich zum Tod der Zelle (Jacobs, 2003; Balaban *et al.*, 2005).

## 1.6 Zielsetzung

Die Bedeutung der Mitochondrien und ihrer Dynamik für die eukaryotische Zelle ist unumstritten. Fehlregulationen können zu einer Reihe von Erkrankungen führen oder die embryonale Entwicklung stören. Ebenfalls entscheidend ist die mitochondriale Morphologie für die Regulation wichtiger Prozesse, wie z.B. dem programmierten Zelltod. Nachdem ein enger Zusammenhang zwischen Apoptose und der Alterung von Zellen besteht (Herker *et al.*, 2004), könnte die mitochondriale Dynamik auch eine bedeutende Rolle bei der Alterung spielen. Bis heute ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die mitochondriale Dynamik wichtig für Alterungsprozesse in *S. cerevisiae* oder anderen eukaryotischen Organismen ist. Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Regulation der mitochondrialen Morphologie sowie für die Bedeutung und Notwendigkeit der mitochondrialen Fusion und Teilung für die Entwicklung und die Alterung von eukaryotischen Zellen zu finden. Zusätzlich sollte der programmierte Zelltod und sein Nutzen für den einzelligen Organismus *S. cerevisiae* näher untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Funktion der beiden mitochondrialen F-Box Proteine Mfb1 und Mdm30 bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie in Hefe untersucht. Um die Auswirkungen der Fehlregulierung der mitochondrialen Morphologie auf die zelluläre Entwicklung zu untersuchen, wurde die Sporulation von Hefezellen mit Hilfe der Fusionsmutanten  $\Delta mdm30$  und  $\Delta mfb1$  im Detail betrachtet. Dabei sollte überprüft werden, inwieweit der Verlust der mitochondrialen Fusion Auswirkungen auf die Vererbung der Mitochondrien sowie auf die Entwicklung der Sporen selbst hat. Weiterhin wurden die Auswirkungen des programmierten Zelltodes auf Mitochondrien sowie auf das langfristige Überleben von Hefezellen näher betrachtet. Mittels Elektronenmikroskopie wurde die Integrität von isolierten, *in vitro* mit dem proapoptotischen Faktor Bax behandelten Mitochondrien untersucht. In Wachstumsexperimenten mit einer  $\Delta yca1$ -Mutante sollten die Auswirkungen einer blockierten oder zumindest verzögerten Apoptose auf die langfristige Überlebensfähigkeit von Hefezellen überprüft werden. Durch Inkubation mit wildtypischen Zellen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wurde zudem untersucht, inwieweit Hefezellen vom programmierten Zelltod anderer Hefezellen profitieren können. Als nächstes wurden die Auswirkungen von fehlregulierter mitochondrialer Morphologie auf das Überleben von Hefezellen unter Hungerbedingungen näher betrachtet. Dabei wurde auch

der Zusammenhang zwischen Apoptose und Alterung untersucht. Im letzten Teil der Arbeit sollte eine mögliche Relation zwischen mitochondrialer Dynamik und dem replikativen Alter von Hefezellen untersucht werden. Dazu wurde die mitochondriale Fusions- und Teilungsdoppelmutante  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$  hergestellt. Von dieser Doppelmutante wurden replikativ gealterte Zellen isoliert und damit verschiedene Experimente durchgeführt, um zu erfahren, inwieweit mitochondriale Fusion und Teilung wichtig für die Alterung von Hefekulturen sind.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

Chemikalien wurden generell von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) im Reinheitsgrad *p.a.* oder „Für Mikrobiologie“ bezogen. Die eingesetzten Enzyme waren, falls nicht anders angegeben, von Fermentas (St. Leon-Rot).

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 *Isolierung genomischer DNA aus S. cerevisiae*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Hefe wurde das YeaStar<sup>TM</sup> Genomic DNA Kit (Zymo Research, Orange, USA) verwendet.

#### 2.1.2 *Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR*

Ein Reaktionsansatz enthielt neben dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer, PCR Nukleotid Mix, Primer (Reverse Primer und Forward Primer), DNA-Polymerase und Plasmid-DNA bzw genomische DNA aus *S. cerevisiae*. Der Ansatz wurde zunächst bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der Matrizenstränge vorinkubiert. Danach folgten 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Oligonukleotidprimer und Synthese der DNA. Schließlich erfolgte eine Nachinkubation bei 72°C zur Vervollständigung der DNA-Synthese. Für die Standardbedingungen, den Nachweis von Deletionen und den Nachweis des Paarungstyps wurden Reagenzien der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Alle Primer stammen von Metabion (Martinsried). Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Mastercycler ep Gradient S der Firma Eppendorf (Hamburg). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit einem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte auf einem Agarosegel (Kap. 2.1.6). In Tabelle 2.1 sind die Reaktionsbedingungen für die einzelnen PCR-Ansätze und in Tabelle 2.2 alle verwendeten Primer aufgeführt.

**Tabelle 2.1 PCR-Bedingungen**

<u>Experiment</u>	<u>Komponenten</u>	<u>Protokoll</u>
Standardbedingungen	4 µl Gotaq Puffer (5x) 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) 1 µl Forwardprimer (10 µM) 1 µl Reverseprimer (10 µM) 1 µl mtDNA (100 ng) 0,2 µl Gotaq Polymerase (1 U) 12,3 µl ddH <sub>2</sub> O	Schritt 1: 94°C für 2 min Schritt 2 (30 Zyklen): 94°C für 30 s 55°C für 30 s 72°C für 1 min Schritt 3: 72°C für 1 min
Nachweis des Paarungstyps	4 µl Gotaq Puffer (5x) 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) 1 µl Forwardprimer (10 µM) 1 µl Reverseprimer (10 µM) 1 µl gen. DNA (ca. 100 ng) 0,2 µl Gotaq Polymerase (1 U) 12,3 µl ddH <sub>2</sub> O	Schritt 1: 94°C für 2 min Schritt 2 (30 Zyklen): 94°C für 10 s 55°C für 10 s 72°C für 30 s Schritt 3: 72°C für 1 min
Nachweis von Deletionen	4 µl Gotaq Puffer (5x) 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) 1 µl Forwardprimer (10 µM) 1 µl Reverseprimer (10 µM) 1 µl gen. DNA (ca. 100 ng) 0,2 µl Gotaq Polymerase (1 U) 12,3 µl ddH <sub>2</sub> O	Schritt 1: 95°C für 2 min Schritt 2 (30 Zyklen): 97°C für 15 s 55°C für 15 s 72°C für 1 min Schritt 3: 72°C für 1 min

**Tabelle 2.2 Verwendete Primer**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
<b>Primer zur Bestimmung des Paarungstyps</b>	
<i>MAT1</i>	AGT CAC ATC AAG ATC GTT TAT GG
<i>MAT2</i>	GCA CGG AAT ATG GGA CTA CTT CG
<i>MAT3</i>	ACT CCA CTT CAA GTA AGA GTT TG
<b>Primer für Deletionsnachweise</b>	
<i>DNM1</i> in FW	GGG CGA TAT AGA TGA CCT TGA AAA CGC
<i>DNM1</i> out RV	TAA CCT AGA AAT TTC GTT CAT CTA G
<i>KAN</i> Kasette FW	CCG GAT TCA GTC GTC ACT CAT GG
<i>HIS3</i> Kasette	CAT GCA GGC TGG AGC TTA CGA C
<i>FZO1</i> out RV	CGA CAA TAT GCG AAA CTG TAC C

### **2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten**

#### **2.1.3.1 Restriktionsverdau**

Die Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen garantiert den korrekten Einbau des Fragments in das Plasmid. Daher wurden vor allen Klonierungsexperimenten das Fragment sowie der Vektor mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut. Der Enzymverdau erfolgte in allen Fällen parallel.

#### **2.1.3.2 Dephosphorylierung**

Um die Religation der verdauten Plasmide zu verhindern, wurden diese dephosphoryliert. Dazu wurden 5 µl Antarctic Phosphatase-Puffer (NEB, Ipswich, USA), 30 µl Plasmid-DNA und 5 U Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, USA) vermischt und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde eine Hitzeinaktivierung (20 min, 80°C) der Phosphatase durchgeführt.

#### **2.1.3.3 Ligation**

Die Ligation der Fragmente mit dem entsprechenden Vektor erfolgte mit T4-Ligase. Dazu wurden je 5 µl von Fragment und Vektor, 2 µl T4-Ligasepuffer, 0,5 µl T4-Ligase und 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 65°C für 20 min.

### **2.1.4 Hitzeschocktransformation von E. coli-Zellen**

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wurden auf Eis aufgetaut. Der gesamte Ligationsansatz wurde zu den Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C und sofortiges Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Serva, Heidelberg), 1% (w/v) NaCl) wurden die Zellen 30 min bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurde 100 µl Suspension auf LB<sup>Amp</sup>-Platten (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 2% (w/v) Agar-Agar) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.



### **2.1.5 Plasmidreinigung aus *E. coli***

Die Reinigung von kleineren Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen für einen anschließenden Testverdau erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse. Dazu wurden *E. coli*-Zellen in 1,5 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium inokuliert, über Nacht bei 37°C geschüttelt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 1 min bei RT und 18.000 x g geerntet und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose, 2 mg/ml RNaseA) resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) und Invertieren für 5 min auf Eis lysiert. Nach Zugabe von 150 µl KOAc (5 M, pH 4,8) und mischen durch Invertieren wurde der Ansatz erneut 5 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden für 10 min bei 4°C und 18.000 x g zentrifugiert, 0,3 ml Überstand abgenommen, 0,6 ml 96% Ethanol zugegeben und invertiert. Nach Zentrifugation bei 18.000 x g für 15 min bei 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, der Überstand abgenommen und ein weiteres Mal kurz abzentrifugiert. Der restliche Überstand wurde nun abgenommen und das Pellet kurz bei RT stehen gelassen. Das trockene Pellet wurde in 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen, 10 min bei RT inkubiert und anschließend gevortext.

Für die Reinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden transformierte *E. coli*-Zellen in 50 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die anschließende Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit einem NanoDrop®-Spektralphotometer (Thermo, Wilmington, USA). Der Abgleich erfolgte gegen EB-Puffer.

### **2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8%ige Agarose-Flachgele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,35) aufgekocht und anschließend in Flachgelformen gegossen. Die Proben wurden in DNA-Probenpuffer (4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer bei einer Spannung von 110 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt und mit UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht.

### 2.1.7 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.3 zeigt eine kurze Beschreibung der in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide.

**Tab. 2.3 Plasmidliste**

Plasmid	Organismus	Promotor	Gen	Expression	Marker	Referenz
pVT100U-mtGFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	Alkohol-Dehydrogenase-Promotor (ADH)	<i>mtGFP</i>	konstitutiv	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	(Westermann und Neupert, 2000)
pYX113-mtGFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	GAL-Promotor	<i>mtGFP</i>	Galaktose-induzierte Überexpression	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	(Westermann und Neupert, 2000)
pRS416-mtRFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	GAL-Promotor	<i>mtRFP</i>	Galaktose-induzierte Überexpression	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	(Mozdy et al., 2000)
pYX122-mtGFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	Triosephosphat-Isomerase-Promotor (TPI)	<i>mtGFP</i>	Konstitutiv	<i>HIS3/Amp<sup>r</sup></i>	(Westermann und Neupert, 2000)
pVT100U-mtRFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	Alkohol-Dehydrogenase-Promotor (ADH)	<i>mtRFP</i>	konstitutiv	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	Yvonne Brede, Uni Bayreuth
WP1055-erGFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	MET25-Promotor	<i>erGFP</i>	Induziert in Abwesenheit von Methionin	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	(Prinz et al., 2000)
pJDCEX2	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	CUP1-Promotor		CuSO <sub>4</sub> -induzierte Überexpression	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	(Escobar-Henriques et al., 2006)
pJDCEX2-MFB1	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	CUP1-Promotor	<i>MFB1</i>	CuSO <sub>4</sub> -induzierte Überexpression	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	(Dürr et al., 2006)
pJDCEX2- <i>mfb1-Δfbox</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	CUP1-Promotor	<i>mfb1-Δfbox</i>	CuSO <sub>4</sub> -induzierte Überexpression	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	(Dürr et al., 2006)
pJDCEX2-MDM30	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	CUP1-Promotor	<i>MDM30</i>	CuSO <sub>4</sub> -induzierte Überexpression	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	(Escobar-Henriques et al., 2006)
pJDCEX2- <i>mdm30-Δfbox</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	CUP1-Promotor	<i>mdm30-Δfbox</i>	CuSO <sub>4</sub> -induzierte Überexpression	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	(Escobar-Henriques et al., 2006)
pRS313	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>			konstitutiv	<i>HIS3/Amp<sup>r</sup></i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
pRS313-YCA1	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>		<i>YCA1</i>	konstitutiv	<i>HIS3/Amp<sup>r</sup></i>	Yvonne Brede, Uni Bayreuth
pRS425-YCA1-GFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>		<i>YCA1-GFP</i>	konstitutiv	<i>LEU2/Amp<sup>r</sup></i>	Yvonne Brede, Uni Bayreuth
pYES-Abf2-GFP	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	GAL-Promotor	<i>ABF2-GFP</i>	Galaktose-induzierte Überexpression	<i>URA3/Amp<sup>r</sup></i>	(Okamoto et al., 1998)

## 2.2 Methoden der Hefegenetik

### 2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Als Standardmedium wurde YPD-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt (Serva, Heidelberg), 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% (w/v) Glukose) verwendet. YPG-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt (Difco, Lawrence, USA), 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 3% (w/v) Glycerin) diente zur Selektion auf respiratorische Kompetenz. Die Selektion auf Auxotrophiemarker erfolgte mit SD-Medium (0,69% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK), supplementiert mit Stammlösungen an 10 mg/ml Aminosäuren und 2 mg/ml Nukleobasen je nach gewünschter Selektionswirkung, 2% (w/v) Glukose). Bei schlecht wachsenden Stämmen wurde SCD-Medium verwendet (SD-Medium mit Zusatz aller Aminosäuren und Nukleobasen, die nicht für eine Selektion benötigt werden). Mit YPGal-Medium wurde die Expression von Genen induziert, die durch einen *GAL*-Promotor reguliert werden. War gleichzeitig Selektion nötig – z.B. wenn sich der *GAL*-Promotor auf einem Plasmid befand – so wurde SGal- (wie SD-Medium, nur mit Galaktose als Kohlenstoffquelle) bzw. SCGal-Medium (wie SCD-Medium, nur mit Galaktose als Kohlenstoffquelle) verwendet. Zur Isolierung von Mitochondrien wurden die Stämme in halbsynthetischem Laktat-Medium (3 g Hefeextrakt (Serva, Heidelberg), 0,5 g Glukose, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 g  $\text{NaCl}$ , 1,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 ml 1%  $\text{FeCl}_3$ , 22 ml 90% D,L-Milchsäure, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt, pH 5,5 mit NaOH eingestellt) inkubiert. Zur Sporulation wurden diploide Stämme in Sporulationsmedium (1% (w/v) Kaliumacetat, 2% (w/v) Agar-Agar, essentielle Aminosäuren) inkubiert. Die Inkubation unter Hungerbedingungen erfolgte ebenfalls in Sporulationsmedium. Zur Selektion auf Kanamycinresistenz wurde G418-haltiges (Geneticin, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) Medium verwendet. Für die *in vivo* Translation wurden die Zellen in SC $\text{Raf}$ -Medium (wie SCD-Medium, nur mit Raffinose als Kohlenstoffquelle) ohne Methionin vorinkubiert. Zur Entfernung von mtDNA aus Hefezellen wurden diese in YPD-EtBr (50  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid) inkubiert. Für die Überexpression der mutierten Gene *mfb1 $\Delta$ Fbox* und *mdm30 $\Delta$ Fbox* wurden die Zellen in YPD-Medium mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  inkubiert (*CUP1*-Promotor). Zur Reprimierung von Doxycyclin-regulierten Genen wurden die Stämme in YPD-Medium mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin inkubiert. Die Hefezellen wurden standardmäßig bei 30°C kultiviert. Für Tests auf Wachstum unter erschwerten Bedingungen erfolgte die Inkubation bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bei 140 rpm geschüttelt. Hefestämme auf Agarplatten (entsprechendes Medium mit 2% Agar-

Agar) wurden bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert. Zur längeren Lagerung wurden die Stämme in 15% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.2 Herstellung diploider Zellen**

Zwei Stämme unterschiedlichen Paarungstyps wurden getrennt in 10 ml YPD-Flüssigmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde je 1 ml Kultur beider Stämme miteinander vermischt und auf 20 ml mit YPD-Medium aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 3-4 h bei 30°C geschüttelt. Dabei wurde die Bildung von Zygoten, welche durch Fusion der beiden Paarungstypen miteinander entstehen, lichtmikroskopisch überprüft. Sobald Zygoten vorhanden waren, wurde 10 µl aus der entsprechenden Kultur entnommen, in 100 µl steriles ddH<sub>2</sub>O gegeben, gevortext und auf SD-Platten ausplattiert, die so supplementiert waren, dass nur diploide Zellen wachsen konnten. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert, bis Kolonien herangewachsen waren. Die Kolonien wurden auf frische SD-Platten überstrichen. Die erhaltenen Stämme wurden mittels PCR auf ihren diploiden Genotyp überprüft.

### **2.2.3 Herstellung von Doppelmutanten**

Zwei Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp wurden je auf einer YPD-Platte als Strich aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht wurden beide Stämme mit Samt über Kreuz auf eine neue YPD-Platte gestempelt. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurden die Zellen auf eine Selektiv-Platte überstempelt (SD- bzw. antibiotikahaltige Platte), wobei das Medium so beschaffen war, dass nur die durch Paarung aus diploiden Zygoten entstandenen Zellen an der Kreuzungsstelle wachsen konnten. Die Zellen wurden 1 bis 2 Tage inkubiert, Zellmaterial von der Kreuzungsstelle entnommen und auf einer weiteren Selektiv-Platte als Einzelkolonieausstrich aufgetragen. Eine gewachsene Kolonie wurde nun auf einer YPD-Platte ausgestrichen und die darauf gewachsenen Zellen in Sporulationsmedium inokuliert. Nach 2- bis 3-tägiger Inkubation hatten sich genügend Asci gebildet, um mit der Tetradendissektion fortzufahren. Dazu wurde etwas Zellmaterial aus der Kultur entnommen. Die Suspension wurde nach Zugabe von 250 µg/ml Zymolyase 20T für 10 min bei RT inkubiert, um die Zellwand der Asci anzudauen, ohne die Sporen dabei freizusetzen. Etwas Suspension wurde nun auf eine YPD- bzw. YPG-Platte (bei Stämmen, die mtDNA verlieren) übertragen, die Asci mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer Instruments, Somerset, UK) aufgenommen und die einzelnen Sporen auf definierten Stellen abgelegt. Nachdem die

einzelnen Sporen Kolonien ausgebildet hatten, wurden sie auf Selektiv-Platten unter Einhaltung der Positionen als kurze Striche ausgestrichen, um die Doppelmutanten zu identifizieren. Die Doppelmutanten wurden mittels DNA-Isolierung (Kap. 2.1.1) und PCR (Kap. 2.1.3) überprüft, wobei die verwendeten Primer komplementär zu Sequenzen innerhalb der Resistenzkassette (Forward Primer) und ca. 250 bp außerhalb des deletierten Gens (Reverse Primer) waren.

#### **2.2.4 Transformation von Hefe**

Die zu transformierenden Hefestämme wurden in 1,5 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C geschüttelt. DNA aus Lachsspermien (2 mg/ml) wurde 15 min gekocht, gründlich gevortext und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden für 1 min bei 18.000 x g geerntet und mit 240 µl 50% (w/v) PEG 4000 überschichtet. Anschließend wurde 36 µl 1 M LiAc zugegeben. Die Lachsspermien-DNA wurde erneut gevortext und 50 µl zu dem Ansatz gegeben. 1-2 µl Plasmid DNA (0,1-1 µg) wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 34 µl vermischt und zu der Suspension gegeben. Der Transformationsansatz wurde gut gemixt und 90 min bei 42°C geschüttelt. Die Zellen wurden für 1 min bei 18.000 x g abzentrifugiert und in 1 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. 300 µl wurden auf einer entsprechend supplementierten SD-Platte ausplattiert. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden einzelne Kolonien gepickt und auf einer weiteren SD-Platte ausgestrichen (Reinigungsausstrich).

#### **2.2.5 Verwendete Hefestämme**

Die Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme ist in Tabelle 6.1 im Anhang (Kap. 6) aufgeführt.

## 2.3 Methoden der Zellbiologie

### 2.3.1 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* (Drop-Dilution Test)

Die Hefestämme wurden über Nacht in YPG-Medium inkubiert. Alle Kulturen wurden auf optische Dichte von 0,5 bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) eingestellt und folgende Verdünnungsreihe in sterilem ddH<sub>2</sub>O hergestellt: 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 5 µl auf je zwei YPD- und YPG-Platten aufgetragen. Die Platten wurden bei 30°C bzw. bei 37°C inkubiert.

### 2.3.2 Wachstumsanalyse mittels $OD_{600}$ -Messung

Um das Wachstum von Kulturen zu bestimmen, wurde in regelmäßigen Zeitabständen die  $OD_{600}$  der Suspension gemessen. Die erhaltenen Daten wurden halblogarithmisch aufgetragen und aus der daraus resultierenden Geradengleichung die Zellanzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t$  ermittelt. Die Generationszeit (definiert als die Zeit, in der sich die Zellzahl verdoppelt) ergibt sich aus dem reziproken Wert der Teilungsrate (Gleichung 1).

$$g = \frac{\Delta t}{n} = \frac{(t - t_0) \times \log 2}{\log N - \log N_0} \quad (\text{Gl. 1})$$

$g$ : Generationszeit

$\Delta t$ : Zeitdifferenz

$n$ : Anzahl der Generationen

$N_0$ : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt  $t_0 \rightarrow OD_{600}$  zum Zeitpunkt  $t_0$

$N$ : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt  $t \rightarrow OD_{600}$  zum Zeitpunkt  $t$

### 2.3.3 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung erfolgte in abgeänderter Form nach Daum *et al.* (1982). 10 ml einer Vorkultur in Laktat-Medium wurden in 1 l Laktat-Medium verdünnt und bei 30°C geschüttelt. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 1-2 wurden die Zellen für 5 min bei 4.000 x g geerntet. Das Pellet wurde in 50 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, bei 2.000 x g für 5 min abzentrifugiert und das Feuchtgewicht bestimmt. Die Zellen wurden in 20 ml Tris-SO<sub>4</sub> Puffer (100 mM Tris-SO<sub>4</sub>, pH 9,4, 10 mM DTT) resuspendiert und für 10 min bei 30°C geschüttelt. Die Suspension wurde bei 2.000 x g 5 min lang zentrifugiert und das Pellet mit 20 ml Sorbitol Puffer

(1,2 M Sorbitol, 20 mM  $KP_i$ , pH 7,4) gewaschen (2.000 x g, 5 min). Die Zellen wurden erneut in 20 ml Sorbitol Puffer resuspendiert und Zymolyase 20T zugegeben (5 mg/g Zellen). Die Suspension wurde im Schüttler bei 30°C für 20-40 min bis zur Bildung von Sphäroblasten inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis, mit kalten Puffern und Zentrifugation bei 4°C durchgeführt. Die Sphäroblasten wurden bei 4.000 x g für 5 min geerntet, vorsichtig in 20 ml Sorbitol Puffer resuspendiert und erneut bei 4.000 x g 5 min lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Sphäroblasten in 15 ml Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes-KOH, pH 7,4, 1 mM PMSF) resuspendiert, in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit 15 Stößen aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde bei 2.000 x g 5 min lang abzentrifugiert und der Überstand in einem Zentrifugenröhrchen auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in 15 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert, in den Dounce-Homogenisator überführt und mit 15 Stößen homogenisiert. Die Suspension wurde bei 2.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, zu dem anderen Überstand gegeben und bei 12.000 x g 10 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Homogenisierungspuffer (ohne PMSF) resuspendiert und die restlichen Zellfragmente bei 2.000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min lang bei 12.000 x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 0,2-0,5 ml Homogenisierungspuffer (ohne PMSF) resuspendiert und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 2.4.5). Die Mitochondrien wurden mit 5-10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.3.4 DAPI-Färbung der mtDNA**

Mit DAPI lassen sich mtDNA-Nukleotide sowie der Zellkern sichtbar machen, da der Farbstoff in doppelsträngige DNA interkaliert (Williamson und Fennell, 1975; McConnell und Yaffe, 1992). 250 µl einer gut gewachsenen Hefekultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 18.000 x g für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 µl 100% Methanol aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 1,7 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,4) gewaschen (18.000 x g, 30 s) und in 1 ml PBS resuspendiert. 1 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml) wurde zugegeben und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen (18.000 x g, 30 s) und in

200 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Kap. 2.3.9).

### **2.3.5 Calcofluorfärbung der Zellwand**

Die Färbung von Hefezellen mit Calcofluor (Invitrogen, Karlsruhe) dient der Sichtbarmachung der Zellwand. Dadurch können Hefezellen auf die Bildung von Knospungsnarben untersucht werden. Für die Färbung wurden 1,5 ml logarithmisch wachsende Zellen einer Hefekultur für 30 min in 4% Formaldehyd bei RT fixiert und anschließend in 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und 1 µl 5 mM Calcofluor zugegeben. Der Ansatz wurde bei 30°C für 30 min geschüttelt und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Die Betrachtung der Knospungsnarben erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Kap. 2.3.9).

### **2.3.6 Rhodamin-Färbung der Mitochondrien**

Zur qualitativen Untersuchung der Mitochondrien sowie zur Lokalisation von Mfb1 wurden die Mitochondrien mit Rhodamin-B-Hexylester angefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird nur in lebenden Zellen selektiv in Mitochondrien aufgenommen, die ein ausreichend hohes Membranpotential  $\Delta\Psi$  besitzen. Zu 1 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurde 2-4 µl 10 µM Rhodamin-B-Hexylester gegeben und die Kultur 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Kap. 2.3.9).

### **2.3.7 Rhodamin-Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts**

Die Färbung der Zellen mit Rhodamin-Phalloidin dient der Sichtbarmachung des Aktinzytoskeletts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden 50 ml Zellen einer YPD-Kultur in logarithmischer Wachstumsphase direkt mit 10% Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen für 3 min bei 4°C und 5.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 40 ml PBS mit 10% Formaldehyd resuspendiert und 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. 60 µl Zellsuspension wurden mit 3 µl einer Rhodamin-Phalloidin-Stammlösung versetzt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Kap. 2.3.9).



### **2.3.8 Identifizierung von ROS durch Färbung mit Dihydrorhodamin-123 (DHR)**

Dihydrorhodamin-123 (Molecular Probes, Eugene, USA) ist ein membranständiger Farbstoff, der durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu grün fluoreszierendem Rhodam-123 oxidiert wird. Für die Untersuchungen wurde 1 µl DHR-Lösung (2,5 mg/ml in DMSO) zu 500 µl Hefekultur gegeben und diese für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet (1 min, 18.000 x g, RT), in 1 ml PBS gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Als Positivkontrolle dienten Hefezellen, die für 3 h mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 30°C vorinkubiert und anschließend wie beschrieben gefärbt wurden. Die Zellen wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Kap. 2.3.9).

### **2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Nukleotide wurden mit DAPI (Kap. 2.3.4), die Zellwand mit Calcofluor (Kap. 2.3.5), die Mitochondrien mit Rhodamin-B-Hexylester (Kap. 2.3.6) oder mit fluoreszierenden Proteinen (mtGFP bzw. mtRFP), das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin (Kap. 2.3.7) und die erhöhte ROS-Konzentration in den Zellen mit DHR (Kap. 2.3.8) sichtbar gemacht. Die Analyse der Zellen erfolgte an einem Axioplan 2 Imaging Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,3 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Zum Fotografieren der Zellen wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 1% Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger fixiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einer digitalen Schwarzweiß-Kamera und wurden anschließend am Computer mit der Software ScopePro (MediaCybernetics, Bethesda, USA) bearbeitet. Zur Detektion von mtGFP und DHR wurde Filtersatz Nr. 10 verwendet (Anregung: 450-490 nm, Emission: 515-565 nm). Für mtRFP, Rhodamin-Phalloidin und Rhodamin-B-Hexylester wurde Filtersatz Nr. 15 verwendet (Anregung: 540-552 nm, Emission: >590 nm). DAPI- und Calcofluorfärbungen wurden mit Filtersatz Nr. 01 analysiert (Anregung: 359-371 nm, Emission: >397 nm).

### **2.3.10 Aufreinigung replikativ gealterter Hefezellen**

Die Separation der Mutterzellen diente der Analyse replikativ gealterter Hefezellen. Das Aufreinigungsprinzip basiert auf der Tatsache, dass bei der Bildung von Tochterzellen während der Knospung neues Zellwandmaterial gebildet wird. Wird die Zellwand von Hefezellen mit Biotin markiert, sind alle folgenden Tochterzellen unmarkiert. Durch Zugabe von Streptavidin-ummantelten Magnetkügelchen (Invitrogen, Karlsruhe) zur Zellsuspension

können nun die Mutterzellen magnetisch von den nachträglich gebildeten Tochterzellen abgetrennt werden. Durch Wiederholen der Aufreinigungsprozedur können stark gealterte Mutterzellen (20-30 Generationen) zu ca. 90% aufgereinigt werden.

#### *2.3.10.1 Markierung der Zellen mit Biotin*

Zellen einer Übernachtskultur wurden in 50 ml YPD auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 verdünnt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7-1,0 inkubiert. Anschließend wurden ca.  $10^8$  Zellen abgenommen. Dabei wurde angenommen, dass 1  $OD_{600}$   $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml entspricht. Letztlich wurden die Zellen mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend in 0,4 ml PBS resuspendiert. Währenddessen wurde eine Biotin-Lösung (8 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, USA) in 0,3 ml PBS) hergestellt. Diese wurde frisch zur Zellsuspension gegeben und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in 1 ml PBS, um überschüssiges Biotin zu entfernen. Die Zellen wurden dabei vorsichtig in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (3 min, RT, 5.000 rpm). Danach wurden sie in 1 ml YPD aufgenommen und der Ansatz in 1 l YPD überführt.

#### *2.3.10.2 Trennung von Mutter- und Tochterzellen*

Die mit Biotin markierte Kultur wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5.000 rpm) und das Pellet in 40 ml kaltem PBS resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, um die Bildung neuer Tochterzellen zu verhindern. Zur Suspension wurden 0,3 ml Streptavidinummantelte Magnetkügelchen gegeben, welche vorher in 1 ml PBS gewaschen wurden. Es schloss sich eine zweistündige Inkubation an, bei der die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen regelmäßig aufgeschüttelt wurde. Die Magnetkügelchen banden dabei spezifisch über eine Streptavidin-Biotin-Interaktion an markierte Zellen. Das Zentrifugenröhrchen wurde danach in ein Magnetic-Sorter-Rack (NEB, Ipswich, USA) gestellt, sodass die Magnetkügelchen mit den daran haftenden Zellen magnetisch von den anderen Zellen getrennt werden konnten. Nach 20 min wurde vorsichtig ohne Zerstören des entstanden Pellets der Überstand abgenommen und 40 ml eiskaltes YPD zugegeben, ohne die gebundenen Zellen dabei aufzuschütteln. Dieser Aufreinigungsschritt wurde einmal wiederholt. Der nächste Reinigungsschritt erfolgte unter den gleichen Bedingungen, nur dass die Zellen nach der Zugabe von YPD aufgeschüttelt wurden. Zur erneuten Trennung der markierten und unmarkierten Zellen erfolgte eine Inkubation von 15 min. Dieser Schritt wurde sieben weitere Male wiederholt. Am Ende wurden die Zellen in 1,5 ml kaltem YPD aufgenommen und in ein größeres Volumen YPD-

Medium für eine Übernachtskultur gegeben. Um einer Kontamination mit Bakterien vorzubeugen, wurden die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin (jeweils 50 µg/ml Endkonzentration) zu dem Ansatz gegeben. Die Aufreinigung wurde mit dem gleichen Ansatz an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

### **2.3.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

#### *2.3.11.1 Kontrastierung der Zellen*

Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml frisches 2,5%iges Glutaraldehyd in PBS, pH 7,4 zugegeben und 1 h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x für 20 min mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Kontrastierung der Zellen erfolgte mit 2% (w/v) OsO<sub>4</sub> für 4 h bei 4°C. Danach wurden die Proben 3x für 20 min mit je 1 ml PBS gewaschen. Es folgte eine weitere Kontrastierung mit 2% (w/v) Uranylacetat (UAc) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x für 20 min mit je 1 ml ddH<sub>2</sub>O bei RT gewaschen.

#### *2.3.11.2 Entwässerung und „Critical-Point-Drying“*

Die Deckgläschen wurden in Halterungen gelegt und diese in Fläschchen gestellt. Die Proben wurden nacheinander je 1x für 15 min mit 25%, 50%, 75%, 96% Aceton und 3x für 20 min mit 100% Aceton bei -20°C entwässert. Anschließend wurde in den Proben in 7 Zyklen das Aceton sukzessive gegen CO<sub>2</sub> ausgetauscht.

#### *2.3.11.3 Mikroskopie*

Die Deckgläschen wurden auf eine Halterung geklebt und mit Gold bedampft. Anschließend erfolgte die Betrachtung der Zellen in einem FEI XL 30 ESEM Rasterelektronenmikroskop (Philipps).

### **2.3.12 Transmissions-Elektronenmikroskopie**

#### *2.3.12.1 Präparation von isolierten Mitochondrien*

Isolierte und mit Bax behandelte bzw. unbehandelte Mitochondrien (freundlicherweise bereitgestellt von Chris Meisinger) wurden zunächst in eiskaltem PBS-Sorbitol (PBS; 0,6 M Sorbitol) gewaschen (10.000 x g, 10 min), in Fixierungspuffer (50 mM Hepes, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5% Glutaraldehyd, pH 7.4) resuspendiert und 3 h auf Eis inkubiert. Danach wurde die

Probe 3x mit Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) gewaschen und anschließend noch 3x mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen (10.000 x g, 10 min). Als nächstes wurde die Probe für 10 min mit Kontrastierungslösung (1% (v/v)  $\text{OsO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) inkubiert, mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 2% Agarose Typ IX (Cambrex Bio Science, Rockland, USA) eingebettet. Es wurden 1x1 mm große Blöckchen geschnitten und diese mit Aceton entwässert und kontrastiert: Zunächst erfolgte eine Inkubation in 30% Aceton für 15 min bei 4°C gefolgt von einer 90minütigen inkubation bei RT in 1% UAc in 50% Aceton im Dunkeln. Danach erfolgte jeweils eine 15minütige Inkubation bei -20°C in 70%, 80%, 90% und 96% Aceton. Schließlich wurden die Blöckchen 3x für 15 min bei -20°C in 100% Aceton entwässert. Zur Polymerisation wurden die Proben über Nacht bei -20°C in 1:1 Spurr/Aceton (Spurr, 1969) inkubiert. Danach erfolgte eine 3stündige Inkubation in Spurr/Aceton (3:1). Schließlich wurden die Proben in purem Spurr für 12 Stunden inkubiert, wobei das Spurr alle drei Stunden gewechselt wurde. Die Polymerisation erfolgte für 48 Stunden bei 55°C.

#### *2.3.12.2 Präparation von Hefezellen*

Hefezellen wurden über Nacht in 50 ml YPD- bzw. YPG-Flüssigmedium inkubiert und in logarithmischer Wachstumsphase geerntet (3.000 x g, 5 min). Das Pellet wurde in PBS gewaschen (3.000 x g, 5 min) und in Cacodylat-Puffer (0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,2) mit 2% Glutaraldehyd resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min bei 4°C fixiert, für 5 min bei 3.000 x g abzentrifugiert und anschließend 3x mit Cacodylat-Puffer gewaschen (3.000 x g, 5 min). Danach wurden die Zellen in Tris-Sorbitol-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,4 M Sorbitol) mit 0,15 mg/ml Zymolyase 20T und 0,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Cacodylat-Puffer gewaschen (3.000 x g, 5 min), in 1 ml Cacodylat-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 18.000 x g für 5 min wurden die Zellen zweimal in Kontrastierungslösung (0,5% (v/v)  $\text{OsO}_4$ , 0,8% (v/v) K-Ferrozyanid) resuspendiert, für 5 min bei 4°C kontrastiert und bei 18.000 x g für 5 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen (18.000 x g, 5 min) und in 2% Agarose Typ IX eingebettet. Es wurden 1x1 mm große Blöckchen geschnitten und mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Die Blöckchen wurden über Nacht bei 4°C in 1% UAc kontrastiert und anschließend mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Zur Entwässerung wurden die Blöckchen je einmal für 15 min in 25%, 50%, 70% und 90% Aceton und anschließend dreimal für 20 min in

100% Aceton inkubiert. Es folgte eine Inkubation in einem Spurr-Aceton-Gemisch (Spurr, 1969) mit einem Verhältnis von 1:3, 1:1 und 3:1 für je 4 h bzw. über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Blöckchen in purem Spurr 3x für 4 h bzw. über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurden die Blöckchen in mit Spurr gefüllte Beam-Kapseln (BAL-TEC, Witten) gegeben, 3-4 h bei 40°C vorpolymerisiert und schließlich für 2-3 Tage bei 50°C fertigpolymerisiert.

#### *2.3.12.3 Herstellung von Ultradünnschnitten*

Nach dem Trimmen der auspolymerisierten Blöckchen mit Hilfe einer Diamantfräse (EM TRIM, Leica, Bensheim) wurden mit Hilfe eines Diamantmessers (Diatome, Biel, Schweiz) an einem Ultramikrotom (Leica Ultracut UCT, Leica, Bensheim) Dünnschnitte der Hefezellen angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetze („slot grids“, 2x1 mm, Plano, Wetzlar) gelegt und nachkontrastiert. Dazu wurden die Netze 10 min in 2% (w/v) UAc inkubiert und anschließend 3x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden sie für 3 min in Bleizitrat-Lösung (4,12 g Na-Citrat in 50 ml ddH<sub>2</sub>O + 3,13 g PbNO<sub>3</sub> in 50 ml ddH<sub>2</sub>O + 1 M NaOH) gelegt und erneut dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### *2.3.12.4 Mikroskopie*

Die fertig kontrastierten Schnitte wurden bei 3.000facher bis 85.000facher Vergrößerung bei 80 kV an einem EM 902 A Transmissions-Elektronenmikroskop mit Plattenkamera (Carl Zeiss SMT, Oberkochen) untersucht und von ausgewählten Zellen Fotos gemacht. Die Negative (Kodak, Stuttgart) wurden entwickelt und mit einem ScanMaker i900 (Mikrotec, Overath) eingescannt.

#### *2.3.12.5 3D-Rekonstruktion von Mitochondrien*

Für die 3D-Rekonstruktion von Mitochondrien wurden Serien von bis zu 80 Ultradünnschnitten (70 nm) angefertigt. Von den untersuchten Stämmen wurden pro Zelle ca. 30 aufeinanderfolgende Schnitte photographiert, mittels IMOD Software (Kremer *et al.*, 1996) Bilderstapel erzeugt und dreidimensionale Modelle der Zellen und der Mitochondrien am Computer angefertigt.

## **2.4 Methoden der Proteinbiochemie**

### **2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) unter Verwendung von Minigelapparaturen (Biorad, München). Das Gel bestand aus einem 5%igen Sammelgel (5% (v/v) einer 30% Acryl-Bisacrylamid Stammlösung, 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED) und einem 10%igen Trenngel (10% (v/v) einer 30% Acryl-Bisacrylamid Stammlösung, 0,4 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED). Die Elektrophorese wurde in vertikalen Kammern bei 15 mA für 1,5 h durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose geblottet (Kap. 2.4.2). Für die Analyse von Proben nach der *in vivo* Translation (Kap. 2.4.4) wurde eine 15%ige Acrylamidkonzentration für das Trenngel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2 h bei 20 mA in selbstgebauten Apparaturen (Universität Bayreuth).

### **2.4.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)**

Für den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose (Hybond, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) wurde ein Semidryblotting-Gerät (Universität München) verwendet. Dafür wurden drei in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkte Filterpapiere (Whatman, Kent, UK) auf die Grafitanode gelegt, gefolgt von der Membran, dem Gel, weiteren drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren und der Graphitkathode. Der Transfer wurde bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h durchgeführt. Nach Beendigung des Blots wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) TCA) angefärbt, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen.

### **2.4.3 Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion**

Der Nachweis der Proteine erfolgte durch polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum. Die Antikörper wurden 1:250 (anti-Fzo1) bzw. 1:500 (anti-Aco1; Ladekontrolle) in PBS-T (PBS + 0,05% (v/v) Tween20) mit 1% Milchpulver verdünnt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 h oder über Nacht in PBS-T mit 2% Milchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (Blockschritt). Anschließend wurde die Membran dreimal für

10 min mit PBS-T gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 h mit einem für das entsprechende Protein spezifischen primären Antikörper. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Für die Immundekoration des gebundenen primären Antikörpers wurde ein sekundärer gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichteter Antikörper verwendet, an den Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (1:10000 in PBS-T mit 1% Milchpulver). Die Membran wurde für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran für 1 min mit ECL-Lösung inkubiert und anschließend mit einem Fuji LAS-Imaging System (LAS 3000, Fuji, Düsseldorf) analysiert.

#### **2.4.4 In vivo Translation mitochondrial codierter Proteine**

Zellen einer SCRaF-Vorkultur wurden zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die gesamte Kultur wurde in 50 ml SCRaF-Flüssigmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Die Zellkultur wurde 4 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und auf eine OD<sub>600</sub> von 3 eingestellt. 250 µl wurden davon entnommen und mit 5 µl frisch hergestelltem Cycloheximid (15 mg/ml in Ethanol) versetzt, wodurch die zytoplasmatische Translation gehemmt wird, jedoch nicht die mitochondriale. Nach 5 min wurden 8 µl Aminosäure-Stammlösung (2 mg/ml von jeder Aminosäure außer Methionin) und 2,4 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (8,4 mCi/ml, Hartmann Analytics, Braunschweig) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 30°C. Danach wurde 3,5 µl unmarkiertes Methionin (2 mg/ml) hinzugefügt, um die Markierung von neuen Proteinen einzuschränken. Der Ansatz wurde für 10 min inkubiert. Die vollständige Beendigung der mitochondrialen Translation erfolgte durch Zugabe von 2,1 µl Chloramphenicol (0,5 mg/ml in Ethanol), welches die Translation in Mitochondrien hemmt. Es folgte eine weitere Inkubation von 10 min. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (12.000 rpm, 15 min, 4°C) und in 500 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Zugabe von 75 µl Lysispuffer wurde die Probe gut gevortext und für 10 min bei RT stehen gelassen. Zur Fällung der Proteine erfolgte eine Zugabe von 600 µl 50% TCA (w/v) und eine Inkubation für 30 min auf Eis. Die Probe wurde daraufhin für 30 min bei 12.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) resuspendiert und für 30 min bei RT geschüttelt. Gegebenenfalls

musste der pH-Wert der Probe mit einem Tropfen 2 M Tris-HCl neutralisiert werden. Nach erfolgter Gelelektrophorese (Kap. 2.4.1) und Western-Blot (Kap. 2.4.2) wurde die Nitrozellulosemembran getrocknet und anschließend in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm (Fuji, Düsseldorf) bedeckt. Nach 24 h Inkubation im Dunkeln wurde der Film entwickelt und das Bandenmuster untersucht.

#### **2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Reagenz Rothi®-Quant (Carl Roth, Karlsruhe). Zu 800 µl einer 1:1000 verdünnten Proteinlösung wurden 200 µl der Farbstofflösung gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm ( $A_{595}$ ) gemessen und anhand einer BSA-Eichgerade die Proteinkonzentration bestimmt.



### 3 ERGEBNISSE

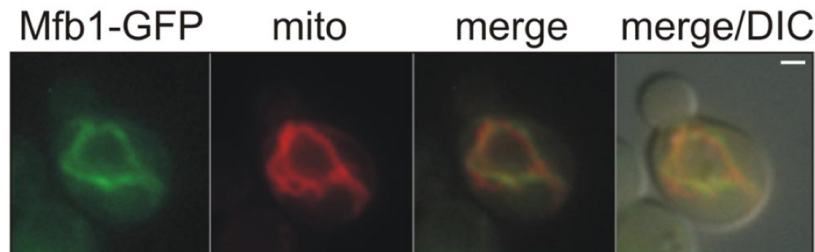
#### 3.1 Die mitochondrialen F-Box Proteine Mfb1 und Mdm30 regulieren die mitochondriale Morphologie in *S. cerevisiae*

F-Box Proteine sind vielseitige Regulatoren unterschiedlichster zellulärer Funktionen (Willems *et al.*, 2004; Petroski und Deshaies, 2005). Normalerweise bilden sie eine Untereinheit der Skp1-Cullin-F-Box (SCF) Ubiquitin Ligasen und dienen der Zielsteuerung von Proteinen für Ubiquitinierung und Abbau im 26S Proteasom. Einige F-Box Proteine können aber auch Funktionen ausüben, die unabhängig von SCF-Komplex und 26S Proteasom sind (Galan *et al.*, 2001). Mdm30 ist ein mitochondrial lokalisiertes F-Box Protein, das als Untereinheit eines SCF-Komplexes den Abbau des mitochondrialen Fusionsproteins Fzo1 im 26S Proteasom vermittelt (Cohen *et al.*, 2008). Um mehr Einsicht in die Funktionen von mitochondrial lokalisierten F-Box Proteinen zu erhalten, wurden im Folgenden die Funktionen von Mdm30 sowie von Mfb1, einem weiteren mitochondrial lokalisierten F-Box Protein, in vegetativ wachsenden Hefezellen als auch während der Sporulation untersucht.

##### 3.1.1 *Mfb1 ist ein mitochondrial lokalisiertes F-Box Protein*

Huh *et al.* (2003) führten eine Studie zur Identifizierung der subzellulären Lokalisation von Hefeproteinen durch. Dazu wurden die einzelnen Proteine mit GFP fusioniert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. Die Untersuchungen deuteten bereits auf eine mitochondriale Lokalisation des Proteins Mfb1 hin. Allerdings wurde bei dieser Durchmusterung lediglich anhand von Form und Ort der Fluoreszenz des Mfb1-GFP-Fusionsproteins auf die Lokalisation in der Zelle geschlossen. Dabei konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich wirklich um eine mitochondriale Lokalisation handelt. In dieser Arbeit wurden für die Bestimmung der subzellulären Position von Mfb1 ebenfalls Hefezellen untersucht, die ein Mfb1-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des endogenen *MFB1*-Promotors exprimierten (Huh *et al.*, 2003). Allerdings wurden zusätzlich die Mitochondrien spezifisch mit Rhodamin-B-Hexylester gefärbt. Da die Mfb1-GFP-Färbung mit der mitochondrialen Fluoreszenz übereinstimmte, konnte die mitochondriale Lokalisation von Mfb1 eindeutig bestimmt werden (Abb. 3.1). Die Tatsachen, dass die Proteine Mfb1 und Mdm30 mitochondrial lokalisiert sind und ein F-Box Motiv besitzen, deuten darauf hin, dass sie ähnliche Funktionen besitzen. Für Mdm30 konnte bereits gezeigt werden, dass das

Protein für den Turn-over des Fusionsproteins Fzo1 verantwortlich ist (Fritz *et al.*, 2003). In vergleichenden Studien mit  $\Delta mfb1$ - und  $\Delta mdm30$ -Mutanten sowie mit einer  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Doppelmutante sollte untersucht werden, ob die F-Box Proteine ähnliche Funktionen besitzen bzw. eine gleichzeitige Deletion zu einer Verstärkung der Defekte führt.



**Abb. 3.1 Lokalisation von Mfb1.** Hefezellen, die ein Mfb1-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen *MFB1*-Promotors exprimieren, wurden in glukosehaltigem Medium (YPD) bis zur Log-Phase inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit Rhodamin-B-Hexylester angefärbt. Die Hefezellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und differentieller Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) untersucht. Die Rhodaminfluoreszenz (mito) wurde zuerst untersucht, um Photokonversion zu vermeiden. Größenmaßstab, 1  $\mu$ m. (Dürr *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Die Deletion von *MFB1* bzw. *MDM30* führt zu einem mitochondrialen Morphologiedefekt

Vegetativ wachsende Hefezellen besitzen ein tubuläres, verzweigtes mitochondriales Netzwerk, dessen Verzweigung bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerin) ausgeprägter ist als bei Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glukose (Visser *et al.*, 1995; Egner *et al.*, 2002). Die Deletion von *MDM30* führt bei Wachstum auf Glukose zur Aggregation der Mitochondrien, während das Wachstum auf Glycerin zur Fragmentierung führt (Fritz *et al.*, 2003). Nachdem Mfb1 ebenfalls ein mitochondrial lokalisiertes F-Box Protein ist, stellte sich die Frage, ob es, genau so wie Mdm30, an der Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt ist.

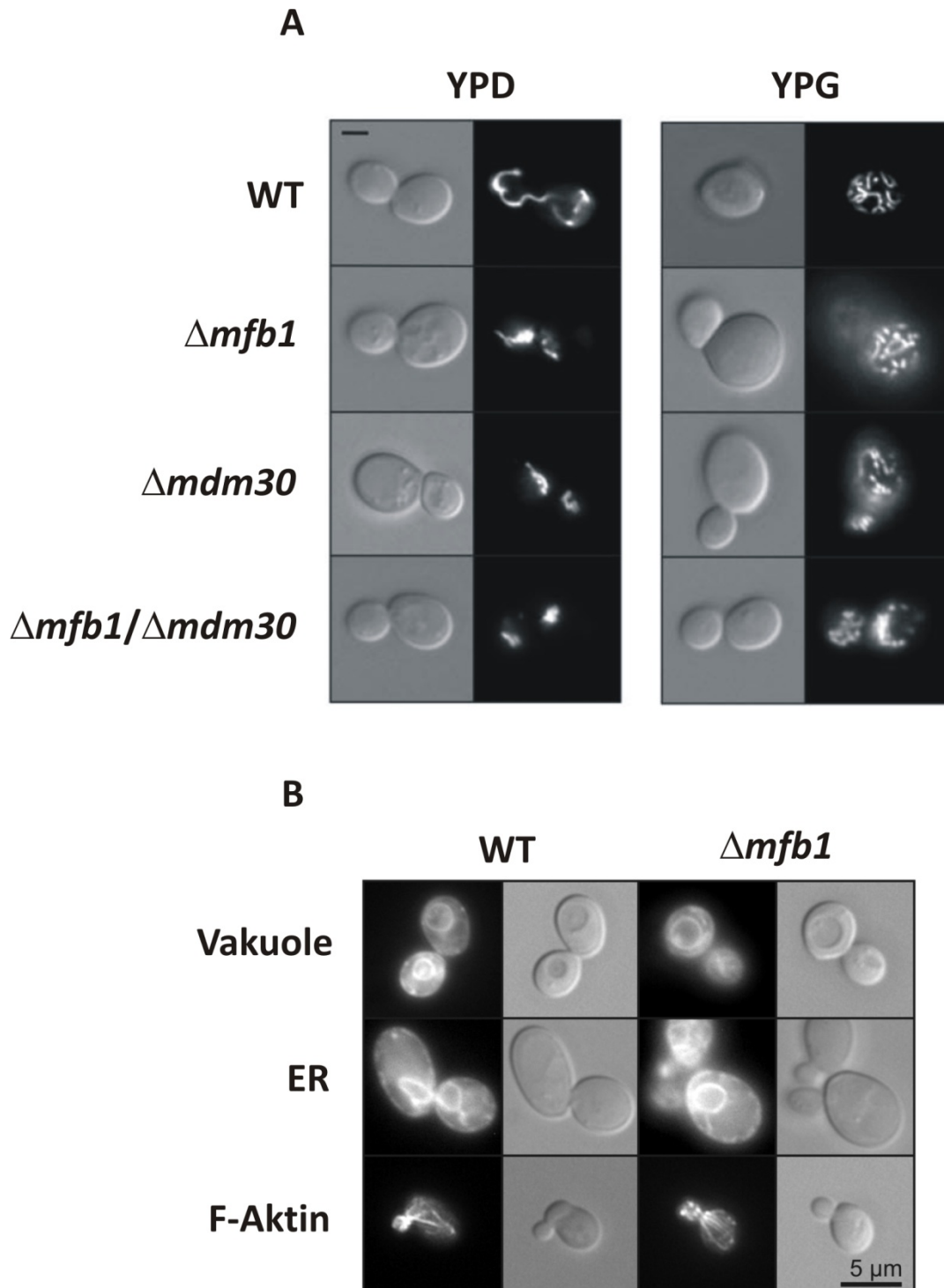
Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion des Gens *MFB1* einen ähnlichen, wenn auch nicht so ausgeprägten Phänotyp zur Folge hat wie die Deletion von *MDM30*. Bei Wachstum auf Glycerin lagen die Mitochondrien in 57,9% der Zellen fragmentiert vor (95,7% in der  $\Delta mdm30$ -Mutante). Wachstum auf Glukose führte, wie in der  $\Delta mdm30$ -Mutante, zur Aggregation der Mitochondrien in über 80% der Zellen (Abb. 3.2 A und Tab. 3.1). Um auszuschließen, dass der mitochondriale Phänotyp in der  $\Delta mfb1$ -Mutante ein sekundärer Effekt ist, wurden das Aktinzytoskelett, das endoplasmatische Retikulum (ER) sowie die Vakuole fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei konnten keine Auswirkungen

der *MFB1*-Deletion auf diese Strukturen beobachtet werden (Abb. 3.2 B). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der mitochondriale Phänotyp sehr wahrscheinlich direkt durch die Deletion von *MFB1* hervorgerufen wird. In früheren Untersuchungen wurden die gleichen Beobachtungen in der  $\Delta$ *mdm30*-Mutante gemacht (Fritz *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass Mfb1, ebenso wie Mdm30, eine direkte Funktion für die Regulation der mitochondrialen Morphologie besitzt.

**Tabelle 3.1 Mitochondriale Phänotypen während vegetativem Wachstum**

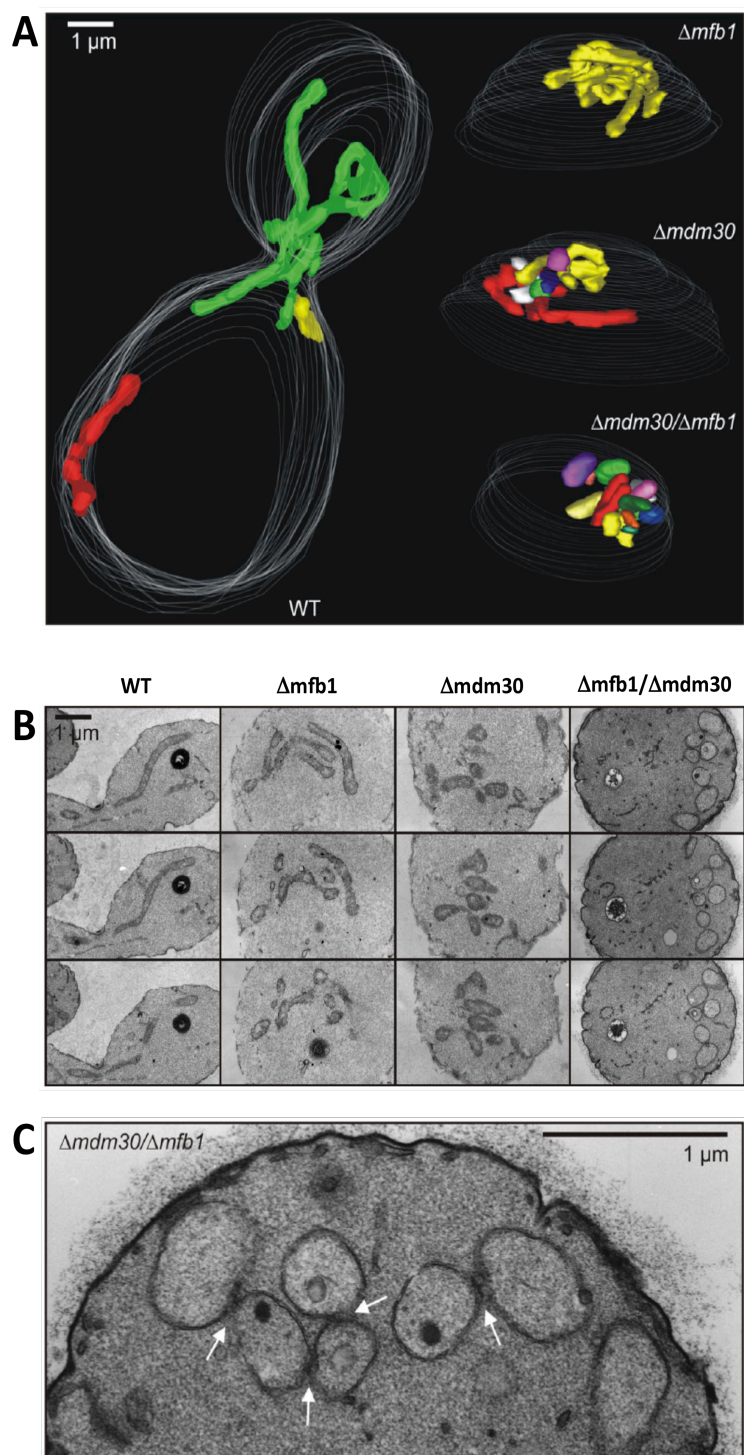
Stamm/Medium	Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			ausgezählte Zellen
	wildtypisch	aggregiert	fragmentiert	
YPD				
WT (BY4742)	91,1	5,1	3,8	315
$\Delta mfb1$	9,4	84,7	5,9	374
$\Delta mdm30$	10,4	88,4	1,2	346
$\Delta mfb1/\Delta mdm30$	1,8	83,7	14,5	339
YPG				
WT (BY4742)	84,6	0,9	14,5	315
$\Delta mfb1$	39,2	2,9	57,9	374
$\Delta mdm30$	3,7	0,6	95,7	346
$\Delta mfb1/\Delta mdm30$	1,3	1,3	97,4	339

Der Wildtyp sowie die  $\Delta$ *mfb1*-, die  $\Delta$ *mdm30*-Mutante und die  $\Delta$ *mfb1*/ $\Delta$ *mdm30*-Doppelmутante wurden in YPD- bzw. YPG-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Die Mitochondrien wurden mittels mtGFP angefärbt. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht und gezählt.



**Abb. 3.2 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie.** (A) Der Wildtyp sowie die  $\Delta mfb1$ -, die  $\Delta mdm30$ -Mutante und die  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Doppelmutante wurden in YPD- bzw. YPG-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Die Mitochondrien wurden mittels mtGFP angefärbt. Anschließend wurden die Zellen durch DIC- (links) und Fluoreszenzmikroskopie (rechts) untersucht. Größenmaßstab, 2  $\mu$ m. (B) Zellen mit deletiertem Mfb1 besitzen normale Vakuolen, sowie ein intaktes ER und Aktinzytoskelett. Vakuolen in lebenden WT- und  $\Delta mfb1$ -Zellen wurden mit 5-(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat angefärbt. Das ER wurde mittels ER-lokalisiertem GFP sichtbar gemacht. Zur Färbung des Aktinzytoskeletts wurden die Zellen fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt (Fluoreszenz links, DIC rechts). (Dürr *et al.*, 2006)

Obwohl die mitochondrialen Phänotypen beider Mutanten ähnlich sind, können ultrastrukturelle Unterschiede vorhanden sein. Um solche Unterschiede sichtbar zu machen, wurden Ultradünnschnitte (70 nm) von Wildtyp-Zellen,  $\Delta mfb1$ -,  $\Delta mdm30$ - und  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Zellen hergestellt und elektronenmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden Serienschritte angefertigt, um ein dreidimensionales hochaufgelöstes Modell der Mitochondrien zu erstellen (Abb. 3.3 A und B). Tatsächlich unterscheiden sich die mitochondrialen Phänotypen der beiden Mutanten voneinander. Anhand der dreidimensionalen Rekonstruktion der Mitochondrien aus 30 Ultradünnschnitten (entsprechen 2100 nm) konnte gezeigt werden, dass sich die Aggregate in der analysierten  $\Delta mdm30$ -Zelle aus sieben unterschiedlichen Organellen zusammensetzten (Abb. 3.3 A). Im Gegensatz dazu zeigte die Rekonstruktion aus 27 Ultradünnschnitten der untersuchten  $\Delta mfb1$ -Zelle (entsprechen 1890 nm), dass das Aggregat aus einem einzigen Mitochondrion bestand (Abb. 3.3 A). Im Falle der  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Zelle war die Fragmentierung der Mitochondrien sogar noch ausgeprägter als in der  $\Delta mdm30$ -Zelle. Hier zeigte die Rekonstruktion aus 18 Ultradünnschnitten (entsprechen 1260 nm), dass es sich bei den aggregierten Mitochondrien um 16 kleine, morphologisch unterschiedliche Organellen handelte (Abb. 3.3 A). Beim Wildtyp konnten drei einzelne mitochondriale Strukturen beobachtet werden (31 Ultradünnschnitte; entsprechen 2170 nm) (Abb. 3.3 A). Die Untersuchungen wurden mit jeweils mindestens einer weiteren Zelle wiederholt, wobei die Ergebnisse sehr ähnlich waren. Für die Untersuchungen wurden die Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen aus glukosehaltigem Medium geerntet und jeweils nur Zellen untersucht, die eine Knospe besaßen.



**Abb. 3.3 Ultrastrukturelle Analyse der Mitochondrien.** (A) WT,  $\Delta mfb1$ -,  $\Delta mdm30$ - und  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Mutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium kultiviert und anschließend für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorbereitet. Die 3D-Modelle wurden mittels IMOD Software (Kremer *et al.*, 1996) erstellt. Morphologisch unterschiedliche Organellen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Der Umriss der Zellen ist durch weiße Linien dargestellt. (B) Drei repräsentative, aufeinander folgende Schnitte, die für die Rekonstruktion der 3D-Modelle verwendet wurden. (C) Vergrößerte Darstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahme einer  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Zelle (oberster Schnitt in (B)). Die weißen Pfeile zeigen auf elektronendichtes Material an Kontaktstellen zwischen zwei nichtfusionierten Mitochondrien. (Dürr *et al.*, 2006)

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Mitochondrien in der  $\Delta mdm30$ -Mutante sowie in der  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Mutante oft in sehr engem Kontakt zueinander zu finden waren, wobei es jedoch nicht zu einer Fusion kam (Abb. 3.3 C). Zusätzlich war stark elektronendichtes Material an den Berührungspunkten zu erkennen. Dieser Phänotyp entspricht den Anhäufungen von Mitochondrien in Säugerzellen, welche die Fzo1-Homologe Mfn2 (Rojo *et al.*, 2002) bzw. Mfn1 überexprimieren (Santel *et al.*, 2003). Vermutlich bildet überschüssiges Fzo1 in Zellen ohne Mdm30 auf der Oberfläche von Mitochondrien nichtfunktionelle Fusionskomplexe, die nur eine Anbindung aber keine Fusion der Mitochondrien erlauben. Dies wurde bereits in Mutanten beobachtet, welche eine mutierte Form von Mfn2 (Eura *et al.*, 2003) oder eine gekürzte Form von Mfn1 (Koshiba *et al.*, 2004) exprimierten. Das elektronendichte Material in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen könnte somit aus akkumuliertem Fzo1 bestehen.

Der Unterschied zwischen den einerseits aus einzelnen Fragmenten bestehenden mitochondrialen Aggregaten in Zellen ohne Mdm30 und dem mitochondrialen Kontinuum in der  $\Delta mfb1$ -Mutante deutet auf einen unterschiedlichen Mechanismus bei der Bildung der Aggregate und somit auch auf unterschiedliche Funktionen bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie hin.

### **3.1.3 Das F-Box Motiv ist nicht essentiell für die Funktion von Mfb1 und Mdm30**

Um zu überprüfen, ob das F-Box Motiv essentiell für die Funktion der beiden Proteine Mfb1 und Mdm30 bezüglich der Regulation der mitochondrialen Morphologie ist, wurden Mutanten konstruiert, in denen Mfb1 bzw. Mdm30 ohne F-Box Motiv unter Kontrolle eines *CUP1*-Promotors überexprimiert wurde ( $mfb1\Delta Fbox$  und  $mdm30\Delta Fbox$ ; Escobar-Henriques *et al.*, 2006). Interessanterweise stellte sich heraus, dass beide Konstrukte die mitochondrialen Morphologiedefekte zumindest teilweise komplementierten (Tab. 3.2). Dies deutet darauf hin, dass zumindest für die direkte Regulation der mitochondrialen Morphologie für beide Proteine keine Bindung an SCF-Komplexe notwendig ist. Andererseits konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass die Akkumulation von Mfb1 in der Mutterzelle während des Knospungsvorgangs abhängig vom F-Box Motiv ist (Kondo-Okamoto *et al.*, 2006).

**Tabelle 3.2 Funktion des F-Box Motivs bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie**

Stamm/Medium	Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			ausgezählte Zellen
	wildtypisch	aggregiert	fragmentiert	
YPD + Cu <sup>2+</sup>				
<i>Δmfb1</i>	14,7	80,3	5,0	300
<i>Δmfb1/MFB1</i>	69,5	27,2	3,3	305
<i>Δmfb1/MFB1ΔFbox</i>	78,5	20,5	1,0	302
<i>Δmdm30</i>	14,3	80,0	5,7	300
<i>Δmdm30/MDM30</i>	48,0	48,7	3,3	304
<i>Δmdm30/MDM30ΔFbox</i>	59,3	38,7	2,0	300

Der Wildtyp und die Mutanten wurden in YPD-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Die Induktion von *MFB1*, *MDM30* und den  $\Delta$ F-Box Varianten erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> (*CUP1*-Promotor). Die Mitochondrien wurden mittels mtGFP angefärbt.

### **3.1.4 *Mfb1* und *Mdm30* sind die einzigen F-Box Proteine in Hefe, die die mitochondriale Morphologie regulieren**

Das Hefegenom codiert für 21 potentielle F-Box Proteine (Willems *et al.*, 2004). Hier stellt sich die Frage, ob neben *Mfb1* und *Mdm30* weitere F-Box Proteine an der Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit die Mitochondrien in den Deletionsmutanten *Δamn1*, *Δcos111*, *Δdia2*, *Δela1*, *Δgrr1*, *Δhrt3*, *Δrcy1*, *Δskp2*, *Δufo1*, *Δybr280c*, *Δydr131c*, *Δydr306c*, *Δyjl149w*, *Δylr224w*, *Δylr352w* und *Δymr258c* mit mtGFP angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Alle untersuchten Mutanten mit Ausnahme von *Δmfb1* und *Δmdm30* hatten wildtypische Mitochondrien (Abb. 3.4 und Tab. 3.3), was zu dem Schluss führt, dass *Mfb1* und *Mdm30* die einzigen beiden F-Box Proteine in *S. cerevisiae* sind, die an der Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. Drei weitere Gene, die für F-Box Proteine codieren, *CDC4*, *CTF13* und *MET30*, sind essentiell für das Überleben von Hefezellen. Auch hier ergaben Untersuchungen, dass diese Proteine keine Funktion bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie besitzen (Dürr *et al.*, 2006).





**Abb. 3.4 Mitochondriale Morphologie in F-Box Mutanten.** Der Wildtyp und die Mutanten wurden in YPD-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Die Mitochondrien wurden mittels mtGFP angefärbt. Anschließend wurden die Zellen durch DIC- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Bilder stellen Überlagerungen der DIC- und Fluoreszenzaufnahmen dar. (Dürr *et al.*, 2006).

**Tabelle 3.3. Mitochondriale Morphologie in F-Box Mutanten**

Stamm/Medium	Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			ausgezählte Zellen
	wildtypisch	aggregiert	fragmentiert	
YPD				
WT	91,1	5,1	3,8	315
<i>Δamn1 (Δybr158w)</i>	100,0	0	0	100
<i>Δcos111 (Δybr203w)</i>	70,0	25,0	5,0	100
<i>Δdia2 (Δyor080w)</i>	100,0	0	0	100
<i>Δela1 (Δynl230c)</i>	95,0	3,0	2,0	100
<i>Δgrr1 (Δyjr090c)</i>	100,0	0	0	100
<i>Δhrt3 (Δylr097c)</i>	100,0	0	0	100
<i>Δmdm30 (Δylr368w)</i>	10,4	88,4	1,2	346
<i>Δmfb1 (Δydr219c)</i>	9,4	84,7	5,9	374
<i>Δrcy1 (Δyjl204c)</i>	95,0	5,0	0	100
<i>Δskp2 (Δynl311c)</i>	95,0	0	5,0	100
<i>Δufo1 (Δyml088w)</i>	74,0	0	26,0	100
<i>Δybr280c</i>	100,0	0	0	100
<i>Δydr131c</i>	98,0	0	2,0	100
<i>Δydr306c</i>	95,0	5,0	0	100
<i>Δyjl149w</i>	97,0	2,0	1,0	100
<i>Δylr224w</i>	100,0	0	0	100
<i>Δylr352w</i>	100,0	0	0	100
<i>Δymr258c</i>	100,0	0	0	100

Der Wildtyp und die Mutanten wurden in YPD-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Die Mitochondrien wurden mittels mtGFP angefärbt und die Zellen anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt.

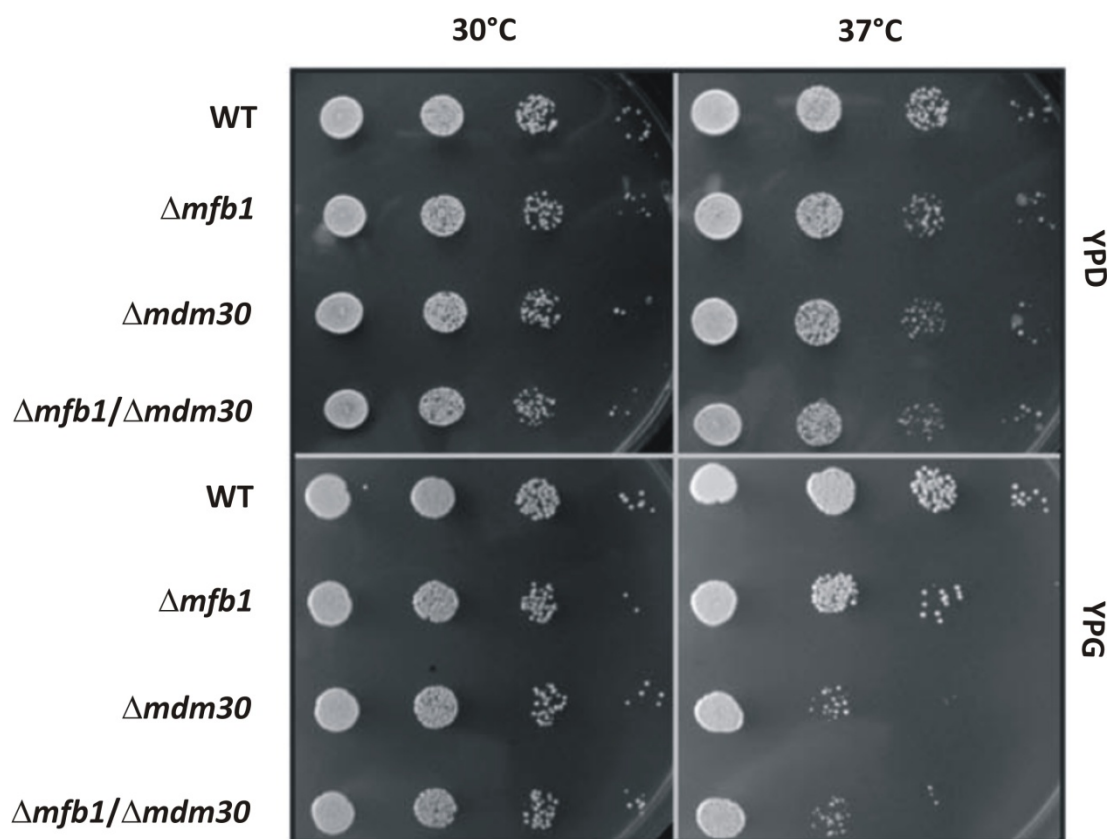
### 3.2 Mitochondriale Fusionsdefekte beeinträchtigen die Zelldifferenzierung in *S. cerevisiae*

Eine Reihe von mitochondrial bedingten Erkrankungen beim Menschen sind auf eine Fehlregulation der mitochondrialen Fusion oder Teilung zurückzuführen (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2006). In *Drosophila melanogaster* führt die Deletion des mitochondrialen Fusionsproteins Fzo zur Bildung von sterilen Männchen, da die Spermatogenese aufgrund des Verlustes der mitochondrialen Fusionsfähigkeit blockiert ist (Hales und Fuller, 1997). Dies zeigt, dass ein gut ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen Teilung und Fusion essentiell für den Organismus sowie für die Differenzierung der Zellen ist. In der Hefe *S. cerevisiae* führen Defekte der mitochondrialen Fusion zu einem Verlust von mtDNA (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Die generelle Fitness der Zellen ist dabei auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen zwar kaum beeinträchtigt, jedoch ist das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen nicht mehr möglich. Dass eine Fehlregulation der mitochondrialen Morphologie nicht zwangsläufig negative Effekte auf den Organismus haben muss, zeigten Untersuchungen an mitochondrialen Teilungsmutanten in Hefe. Die fehlende mitochondriale Teilungsfähigkeit führte hier zu einer erhöhten Fitness und einer verlängerten replikativen Lebensspanne der Zellen (Scheckhuber *et al.*, 2007). Trotz dieser Erkenntnisse ist über die Auswirkungen fehlregulierter mitochondrialer Morphologie auf die zelluläre Entwicklung in einzelnen Zellstadien bisher wenig bekannt. Im Folgenden wurden mit Hilfe der beiden Mutanten  $\Delta mfb1$  und  $\Delta mdm30$  die Auswirkungen fehlregulierter mitochondrialer Morphologie auf die zelluläre Entwicklung, speziell bei der Sporulation von Hefezellen untersucht.

#### 3.2.1 Die Deletion von MFB1 und MDM30 führt zu Wachstumsdefekten

Neben den mitochondrialen Morphologiedefekten sollten auch mögliche Auswirkungen der Deletion der F-Box Proteine auf das Wachstumsverhalten überprüft werden. In früheren Studien zum Effekt der *MDM30*-Deletion konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne das F-Box Protein einen Wachstumsdefekt bei Wachstum auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin bei erhöhter Temperatur (37°C) aufwiesen (Fritz *et al.*, 2003). Nach Untersuchungen in dieser Arbeit zeigte auch die  $\Delta mfb1$ -Mutante einen Wachstumsdefekt bei Inkubation auf Glycerin bei 37°C. Allerdings war dieser nicht so ausgeprägt wie bei der  $\Delta mdm30$ -Mutante (Abb. 3.5). Eine gleichzeitige Deletion des *MFB1*- sowie des *MDM30*-Gens

führte zu dem gleichen Wachstumsdefekt wie im Fall der  $\Delta mdm30$ -Mutante (Abb. 3.5). Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass beide F-Box Proteine für den Erhalt der respiratorischen Funktionen eine Rolle spielen. Dennoch sind die Hefezellen in der Lage, die gleichzeitige Deletion der beiden Proteine zu tolerieren.



**Abb. 3.5 Drop-Dilution Test zur Untersuchung von Wachstumsdefekten.** WT,  $\Delta mfb1$ -,  $\Delta mdm30$ - und  $\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -Mutante wurden über Nacht in YPD inkubiert. Danach wurden Verdünnungsreihen hergestellt und die Zellen auf YPD- bzw. YPG-Platten getropft. Die Platten wurden bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

### 3.2.2 Die Blockierung der mitochondrialen Fusion stört die Sporulation und die Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae*

Während der Sporulation in Hefe erfolgen starke Veränderungen der mitochondrialen Morphologie. Interessanterweise werden die beiden Gene *MFB1* und *MDM30* während der Sporulation induziert (Chu *et al.*, 1998). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese mitochondrialen F-Box Proteine an der Remodellierung der Mitochondrien während der Meiose sowie der Sporulation beteiligt sind. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Verhalten der Mitochondrien in diploiden wildtypischen Zellen sowie in homozygot diploiden  $\Delta mfb1$ - bzw.  $\Delta mdm30$ -Mutanten während den einzelnen Phasen der Sporulation

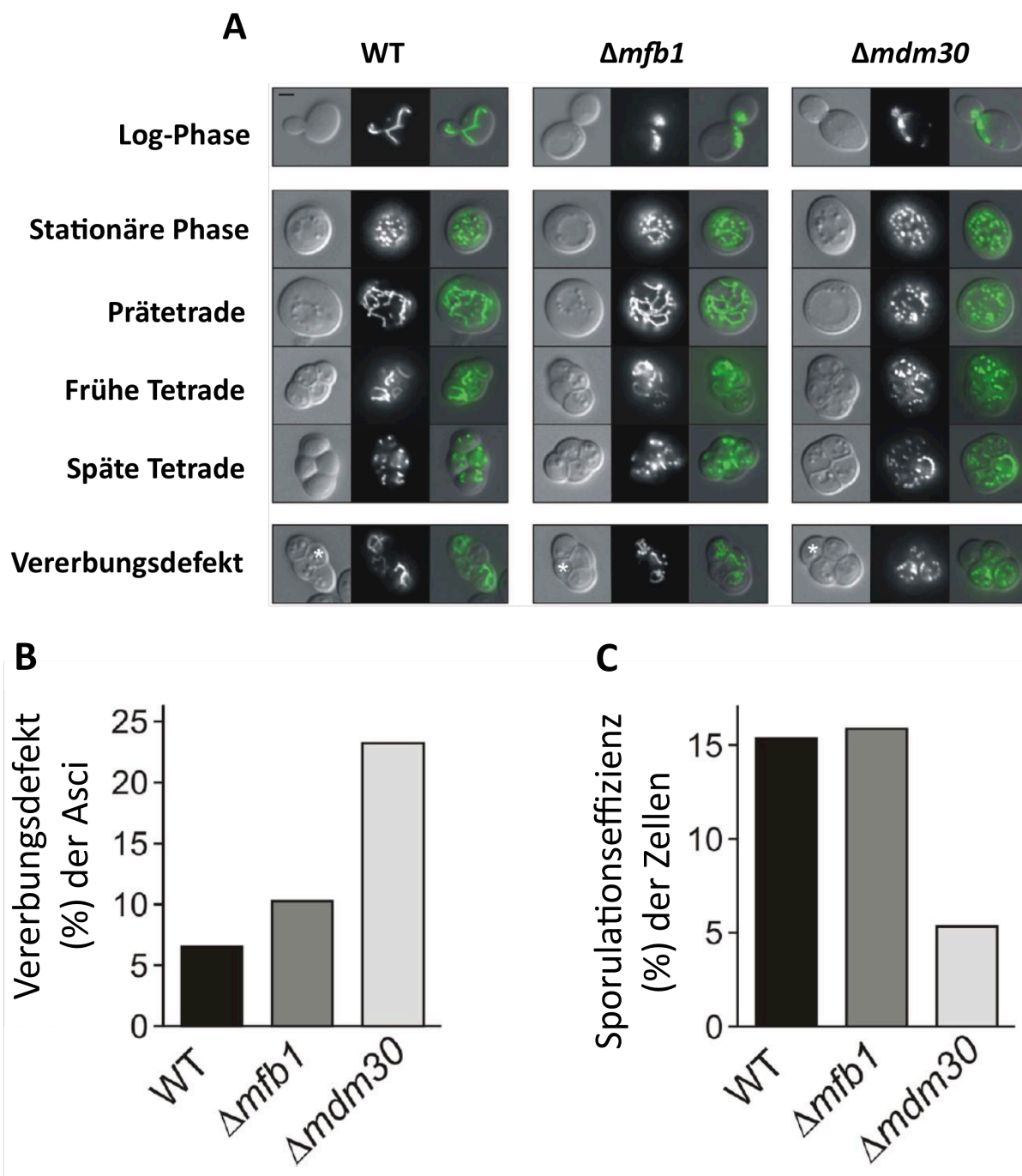
beobachtet. Dazu wurden homozygot diploide Wildtypzellen,  $\Delta mfb1$ - und  $\Delta mdm30$ -Mutanten, welche mitochondrial lokalisiertes GFP exprimieren, bis zur stationären Wachstumsphase in YPD kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Sporulationsmedium überführt und bei 30°C für 12 Tage inkubiert. Während der Sporulation durchlaufen die Mitochondrien in wildtypischen Hefezellen mehrere unterschiedliche Stadien. Beim Übergang vom logarithmischen Wachstum in die stationäre Phase fragmentieren die Mitochondrien. Bei der Bildung der Prätetraden fusionieren die Mitochondrien wieder und wandern schließlich in die einzelnen Sporen. In älteren Tetraden fragmentieren die Mitochondrien wieder, bilden aber bei Eintritt der Sporen in das vegetative Wachstum wieder ein tubuläres Netzwerk aus (Abb. 3.6 A, Tab. 3.4). Im Fall der  $\Delta mdm30$ -Mutante waren die Mitochondrien nicht mehr in der Lage nach erfolgter Fragmentierung in der stationären Phase wieder zu fusionieren (Abb. 3.6 A, Tab. 3.4).

Da die Mitochondrien während der Sporulation mehrmals morphologische Veränderungen durchführen, stellte sich die Frage inwieweit der durch die *MDM30*-Deletion hervorgerufene Defekt Auswirkungen auf die Vererbung der Mitochondrien hat. Um dies zu prüfen, wurden Sporen mit fehlenden Mitochondrien in jungen und alten Tetraden ausgezählt. Bei wildtypischen Zellen besaßen 6,5% der Asci mindestens eine Spore ohne Mitochondrien. In der  $\Delta mfb1$ -Mutante war der Wert leicht erhöht (10,4%). In der  $\Delta mdm30$ -Mutante war der Defekt wesentlich stärker ausgeprägt. Hier fehlten in 23,1% der Asci Mitochondrien in mindestens einer Spore (Abb. 3.6 B). Interessanter jedoch war die Beobachtung, dass die generelle Sporulationseffizienz in der  $\Delta mdm30$ -Mutante (5,3%) nur ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp (15,3%) oder der  $\Delta mfb1$ -Mutante (15,8%) betrug (Abb. 3.6 C). Die verringerte Sporulationseffizienz der  $\Delta mdm30$ -Mutante könnte auf eine wichtige Funktion des Proteins Mdm30 bei Zelldifferenzierung der Prätetraden kurz vor der Bildung der Sporen hinweisen.

**Tabelle 3.4. Mitochondriale Phänotypen während der Sporulation**

Stadium/Stamm	Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			ausgezählte Zellen bzw Asci
	wildtypisch	aggregiert	fragmentiert	
Stationäre Phase				
WT	13,0	0,6	86,4	828
<i>Δmfb1/Δmfb1</i>	5,0	0,6	94,4	813
<i>Δmdm30/Δmdm30</i>	1,5	1,3	97,2	800
Prätetrade				
WT	75,5	2,5	22,0	405
<i>Δmfb1/Δmfb1</i>	62,8	3,0	34,2	404
<i>Δmdm30/Δmdm30</i>	0,8	5,3	93,9	400
Frühe Tetrade				
WT	91,6	3,5	4,9	286
<i>Δmfb1/Δmfb1</i>	85,3	5,3	9,4	266
<i>Δmdm30/Δmdm30</i>	4,1	14,2	81,7	169
Späte Tetrade				
WT	7,1	3,9	89,0	127
<i>Δmfb1/Δmfb1</i>	6,4	1,3	92,3	156
<i>Δmdm30/Δmdm30</i>	0	2,1	97,9	95

Homozygot diploide WT-,  $\Delta mfb1$ - und  $\Delta mdm30$ -Zellen, welche mtGFP exprimieren, wurden zur Sporulation gebracht. In den einzelnen Stadien wurde die mitochondriale Morphologie untersucht.



**Abb. 3.6 Untersuchung der Sporulationseffizienz sowie der Vererbung der Mitochondrien bei der Sporulation.** (A) Homozygot diploide WT-,  $\Delta mfb1$ - und  $\Delta mdm30$ -Zellen, welche mtGFP exprimieren, wurden zur Sporulation gebracht und in den einzelnen Stadien mittels DIC- (links) und Fluoreszenzmikroskopie (Mitte) analysiert (rechts: überlagerte Aufnahmen). Mitochondriale Vererbungsdefekte wurden in frühen und späten Tetraden beobachtet. Ascosporen ohne Mitochondrien sind mit einem Stern markiert. Der Größenmaßstab ist 2  $\mu$ m. (B) Prozentualer Anteil an Asci mit mindestens einer Spore ohne Mitochondrien im frühen und späten Tetradenstadium (ausgezählte Asci: WT, 413;  $\Delta mfb1$ , 422;  $\Delta mdm30$ , 264). (C) Prozentualer Anteil an Zellen, die Asci mit zwei bis vier Sporen während dem späten Tetradenstadium gebildet haben (ausgezählte Zellen: 400 für jeden Stamm).

### 3.3 Untersuchungen zum programmierten Zelltod in *S. cerevisiae*

#### 3.3.1 Die Behandlung mit Bax hat keine Auswirkungen auf die Integrität von Mitochondrien

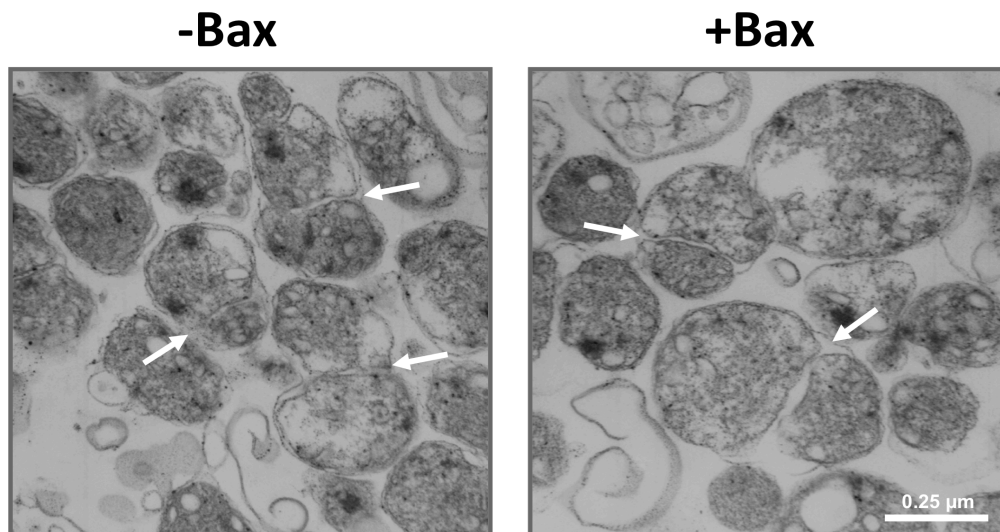
Das proapoptotische Protein Bax induziert in Säugerzellen die Ausschüttung von Cytochrom *c* und anderen pro-apoptotischen Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum, was einen wichtigen Schritt während dem programmierten Zelltod darstellt. Dabei bewirkt Bax eine Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (Jürgensmeier *et al.*, 1998; Eskes *et al.*, 1998). Wie es genau zu dieser Permeabilisierung kommt, ist bis heute nicht geklärt. Es wird spekuliert, dass die beiden mitochondrialen Außenmembrankomplexe TOM (translocase of the outer membrane) und SAM (sorting und assembly machinery) für den Export der Proteine notwendig sind (Pfanner *et al.*, 2004; Motz *et al.*, 2002). Jedoch gibt es sehr wenig experimentelle Daten, um diese Theorie zu unterstützen. In der Arbeit von Sanjuán Szklarz *et al.* (2007) wurde der Effekt des proapoptotischen Proteins Bax auf den Export von Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum (IMS) in isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* untersucht. Interessanterweise führt die Expression von Bax auch in Hefe zur Ausschüttung von Cytochrom *c* und anderen Proteinen aus dem Intermembranraum sowie zur Aktivierung des programmierten Zelltodes, obwohl Bax oder andere Mitglieder der Bcl-2 Familie nicht in Hefe vorkommen (Manon *et al.*, 1997; Ligr *et al.*, 1998). Bei den Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die Ausschüttung der Proteine aus dem IMS darauf zurückzuführen ist, dass die Mitochondrien anschwellen und dabei die mitochondriale Außenmembran zerstört wird. Dazu wurden isolierte Mitochondrien zunächst mit Glutaraldehyd fixiert und mit OsO<sub>4</sub> sowie mit UAc kontrastiert. Anschließend wurden die Proben mit Aceton entwässert und in Spurr eingebettet. Nach erfolgter Polymerisation wurden Ultradünnschnitte angefertigt (70 nm) und die Mitochondrien elektronenmikroskopisch untersucht (Kap. 2.3.12.1). Die Aufnahmen zeigten, dass die Größe der Organellen sowie die Außenmembran nicht verändert waren (Abb. 3.7). Somit ist der in mit Bax behandelten Mitochondrien beobachtete Proteinexport nicht auf eine zerstörte mitochondriale Außenmembran zurückzuführen. Eine interessante Beobachtung war allerdings, dass in 21,1% der behandelten und in 36,8% der unbehandelten Mitochondrien bei intakter Außenmembran die Innenmembran bereits geteilt war (Tab 3.5 und Abb. 3.7, Pfeile). Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass die Teilung der mitochondrialen Außen- und Innenmembran



zumindest zeitlich voneinander getrennt erfolgt. Zudem unterstützen die Ergebnisse die Vermutung, dass die Teilung der Innenmembran nicht durch Dnm1 erfolgt, sondern möglicherweise auf die Funktion des Innenmembranproteins Mdm33 zurückzuführen ist (Messerschmitt *et al.*, 2003).

**Tabelle 3.5. Mitochondriale Ultrastruktur vor und nach Behandlung mit Bax**

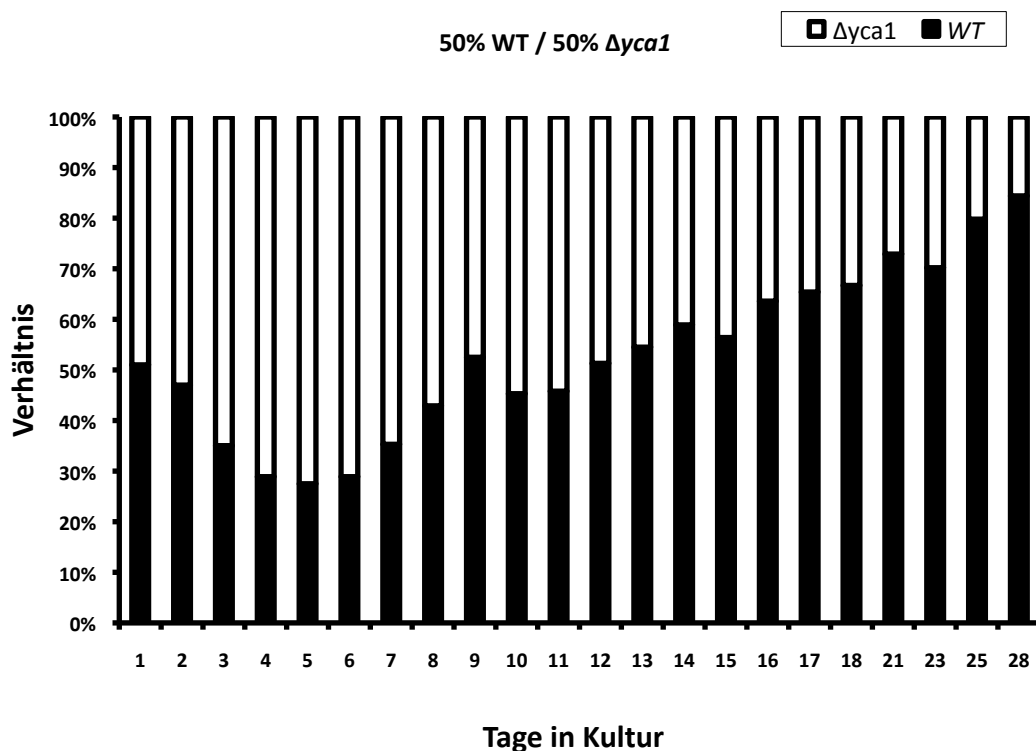
	Ultrastrukturelle mitochondriale Morphologie (% der Mitochondrien)		
	normal	geteilte Innenmembran	ausgez. Mitochondrien
-Bax	63.1	36.8	1238
+Bax	78.9	21.1	1263



**Abb. 3.7 Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur von Bax-behandelten Mitochondrien.** Die Mitochondrien wurden isoliert und mit Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Proben kontrastiert und in Spurr eingebettet. Nach erfolgter Polymerisation wurden Ultradünnschnitte angefertigt (70 nm) und die Mitochondrien elektronenmikroskopisch untersucht. Die weißen Pfeile zeigen auf Mitochondrien mit geteilter Innenmembran und intakter Außenmembran.

### 3.3.2 Apoptose bewirkt einen langfristigen Wachstumsvorteil für Hefekulturen

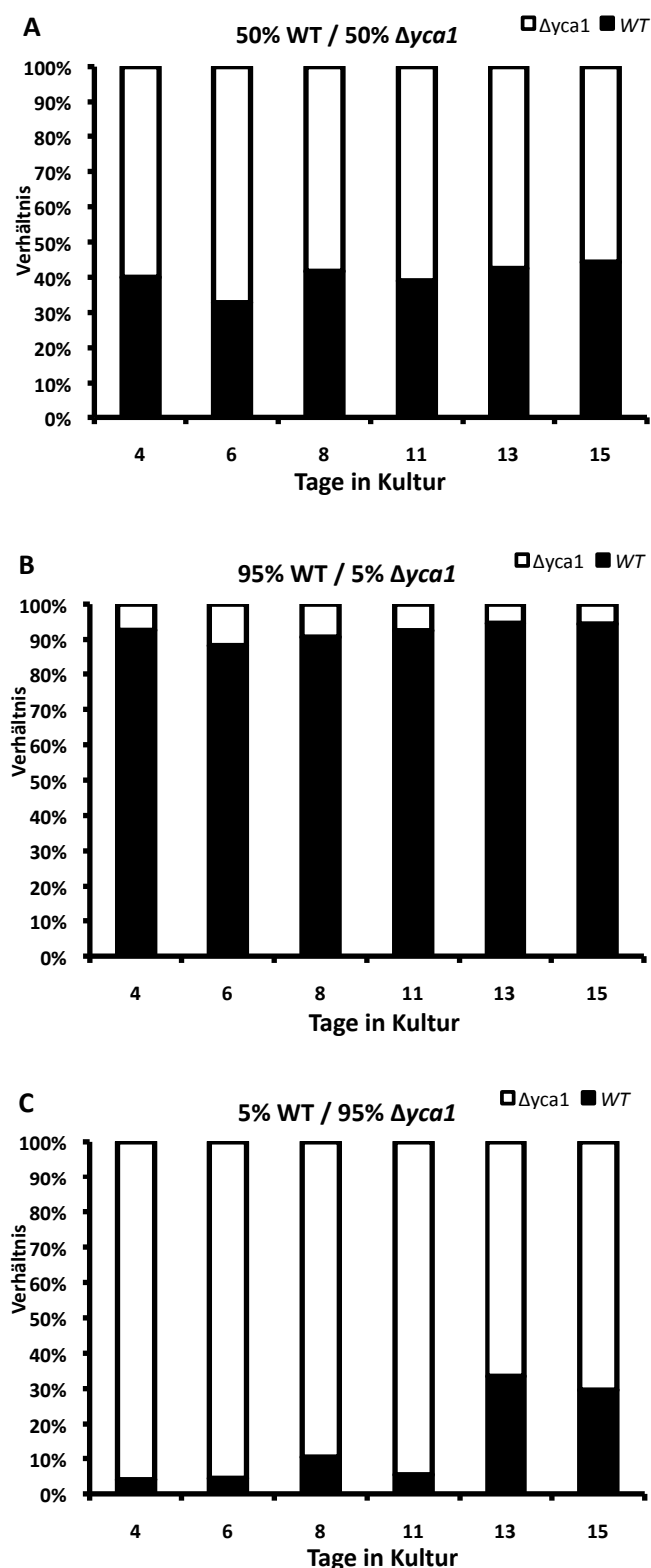
Die Metacaspase Yca1 ist ein proapoptotischer Faktor, der eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod in *S. cerevisiae* spielt. In früheren Studien zur Funktion von Yca1 und zum Nutzen von Apoptose in Hefe wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, in denen Zellen mit deletiertem *YCA1*-Gen zusammen mit wildtypischen Zellen in Flüssigmedium inkubiert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen mit blockierter Apoptose kurzfristig einen Überlebensvorteil gegenüber wildtypischen Zellen besitzen, langfristig jedoch nur wildtypische Zellen überleben (Herker *et al.*, 2004). Ausgehend von diesen Experimenten wurden weitere Untersuchungen gemacht, um ein besseres Verständnis für Sinn und Nutzen des programmierten Zelltodes in Hefe zu erlangen. Für das Konkurrenzexperiment wurden dazu die  $\Delta yca1$ -Mutante und der Wildtyp zunächst getrennt bis zur stationären Phase inkubiert und anschließend in Minimalmedium (SCD-Flüssigmedium) zusammengegeben. In diesem Medium alterten die Zellen chronologisch für ca. 30 Tage.



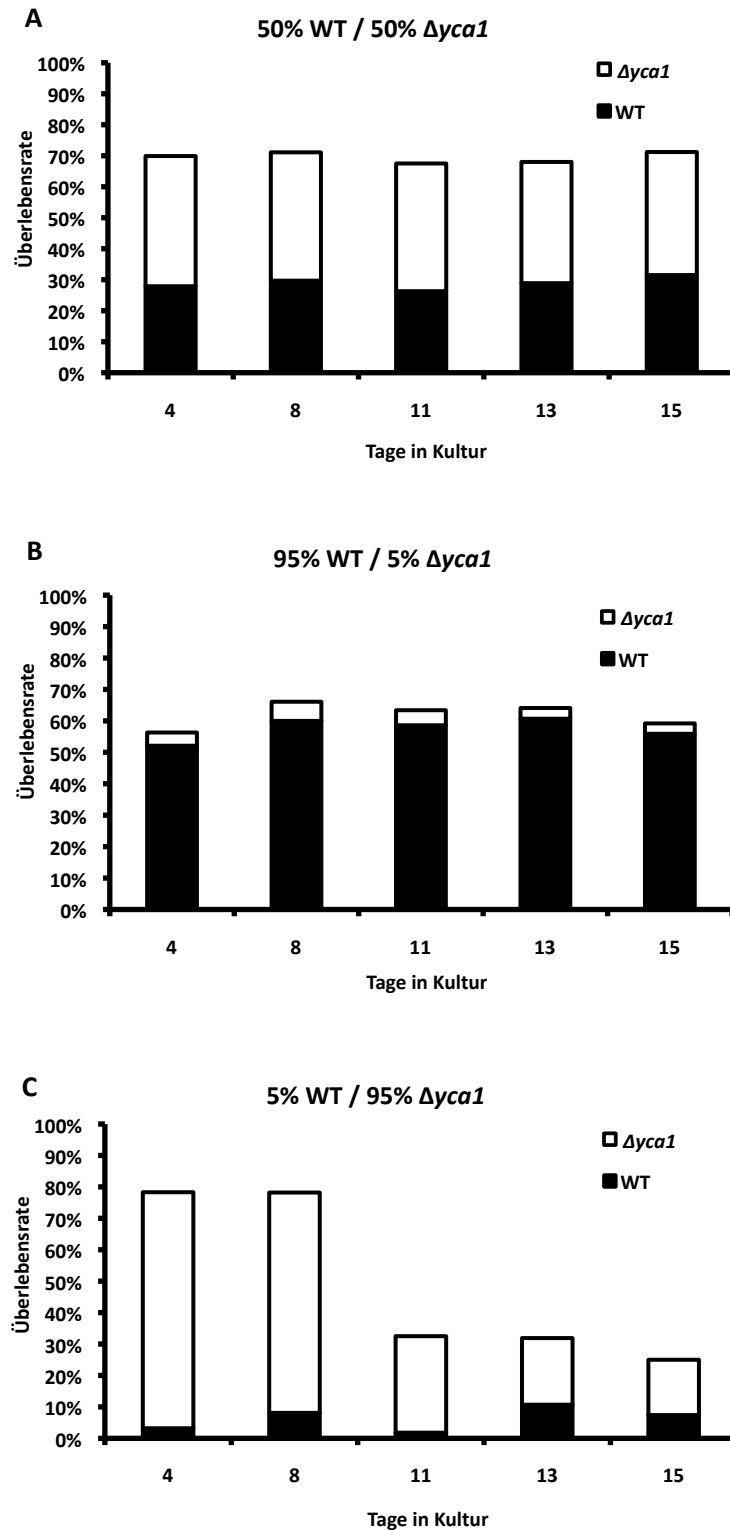
**Abb. 3.8 Konkurrenzexperiment.** WT-Zellen wurden zusammen mit  $\Delta yca1$ -Zellen (Mischungsverhältnis 1:1) in SCD-Flüssigmedium in stationärer Phase inkubiert (chronologische Alterung). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Wiederwachstum anhand von Plattierungsexperimenten überprüft.

Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Wiederwachstum durch Plattierung untersucht. Dazu wurden Proben auf YPD-Platten bzw. auf YPD-G418-Platten ausplattiert. Das Wiederwachstum der *Δyca1*-Zellen wurde anhand der auf der G418-Platte wachsenden Kolonien ermittelt. Das Wiederwachstum der wildtypischen Zellen wurde dadurch ermittelt, dass die gewachsenen Kolonien der G418-Platte von den Kolonien der YPD-Platte subtrahiert wurden. Vor den Plattierungen wurde die Zellzahl mittels Zählkammer ermittelt und 100 Zellen auf die Platten gegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass die *Δyca1*-Mutante zunächst einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp hatte. Jedoch erfolgte nach sechs Tagen eine Trendwende. Danach nahm der Anteil an wildtypischen Zellen in der Kultur stetig zu und lag nach 28 Tagen bei über 80% (Abb. 3.8).

Bei dem Experiment sollte allerdings beachtet werden, dass auch wenn die Zellen sich in der stationären Phase befanden, eine Kohlenstoffquelle und weitere Nährstoffe im Medium vorhanden waren. Um zu überprüfen, ob Zellen mit intakter Apoptose auch unter Hungerbedingungen einen Überlebensvorteil besitzen, wurden die *Δyca1*-Mutante und der Wildtyp gemeinsam bzw. einzeln in Flüssigmedium ohne Zusatz einer Kohlenstoffquelle inkubiert (Sporulationsmedium). Unter diesen Bedingungen können neue Nährstoffe nur durch den apoptotischen Tod von Zellen in der Kultur bereitgestellt werden. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Verhältnis der beiden Stämme fluorezenzmikroskopisch untersucht. Um zwischen den beiden Stämmen unterscheiden zu können, wurden die wildtypischen Zellen mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (grün fluoreszierende Mitochondrien) und die *Δyca1*-Mutante mit dem Plasmid pVT100U-mtRFP (rot fluoreszierende Mitochondrien) transformiert. Für die Untersuchungen wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen beider Stämme in einer Mischkultur hergestellt (50%:50%, 95%:5% und 5%:95%). Bei gleicher Ausgangsmenge beider Stämme blieb das Verhältnis über den gesamten Zeitraum konstant (Abb. 3.9 A). Auch bei Überschuss an wildtypischen Zellen änderte sich das Verhältnis der beiden Stämme nicht (Abb. 3.9 B). Bei 95% *Δyca1*-Zellen im Ansatz stieg der Anteil an WT-Zellen allerdings nach 13 Tagen auf ca. 30% an (Abb. 3.9 C).

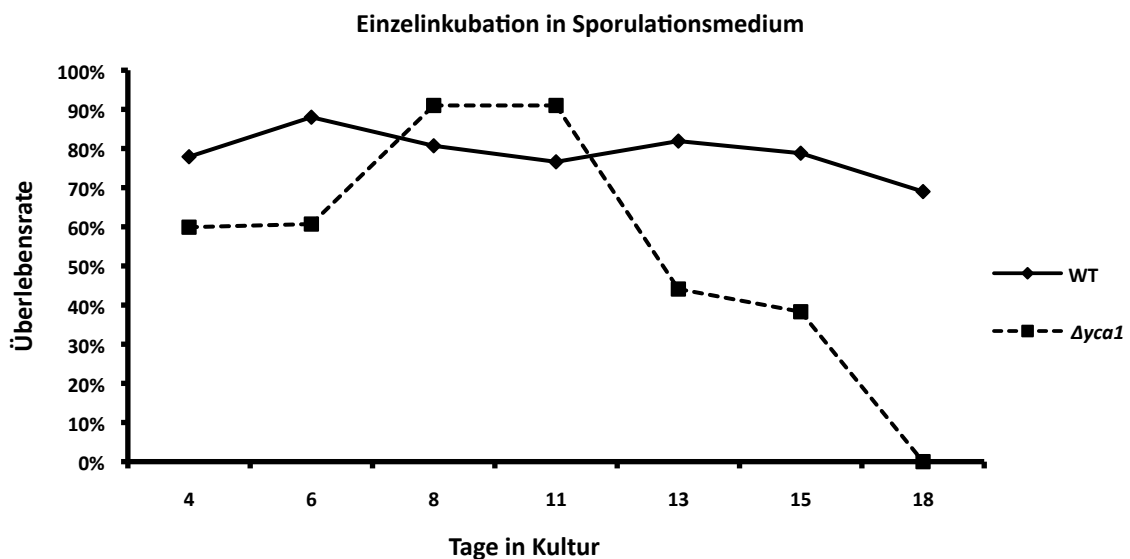


**Abb. 3.9 Chronologische Alterung unter Hungerbedingungen.** mtGFP-exprimierende WT-Zellen wurden zusammen mit mtRFP-exprimierenden  $\Delta yca1$ -Zellen in Sporulationsflüssigmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (A) Mischungsverhältnis am Tag 0: jeweils 50%. (B) Mischungsverhältnis am Tag 0: 95% WT-Zellen und 5%  $\Delta yca1$ -Zellen. (C) Mischungsverhältnis am Tag 0: 5% WT-Zellen und 95%  $\Delta yca1$ -Zellen.



**Abb. 3.10 Test auf Wiederwachstum.** WT- und  $\Delta yca1$ -Zellen wurden in Sporulationsflüssigmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Zellen auf YPD- und G418-Platten ausplattiert und das Wiederwachstum anhand der gewachsenen Kolonien ermittelt. Es wurden je 100 Zellen ausplattiert. (A) Mischungsverhältnis am Tag 0: jeweils 50%. (B) Mischungsverhältnis am Tag 0: 95% WT-Zellen und 5%  $\Delta yca1$ -Zellen. (C) Mischungsverhältnis am Tag 0: 5% WT-Zellen und 95%  $\Delta yca1$ -Zellen.

Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurden die beiden Stämme zusätzlich auf Wiederwachstum getestet. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse der Wachstumsanalysen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigen: Bei einem Anteil von jeweils 50% im Ansatz lag das Wiederwachstum der Mischkultur über den gesamten Zeitraum bei ca. 70%, wobei das Verhältnis der beiden Stämme konstant blieb (Abb. 3.10 A). Bei 95% WT-Zellen im Ansatz lag die Überlebensrate der Gesamtkultur zwischen 60% und 70%. Auch hier blieb das Verhältnis der beiden Stämme konstant (Abb. 3.10 B). Bei einem Anteil von 95%  $\Delta yca1$ -Zellen lag die Überlebensrate der Gesamtkultur anfangs ebenfalls im Bereich um 70%. Jedoch erfolgte nach 11 Tagen ein starker Einbruch und das Wiederwachstum betrug nur noch ca. 30% (Abb. 3.10 C).



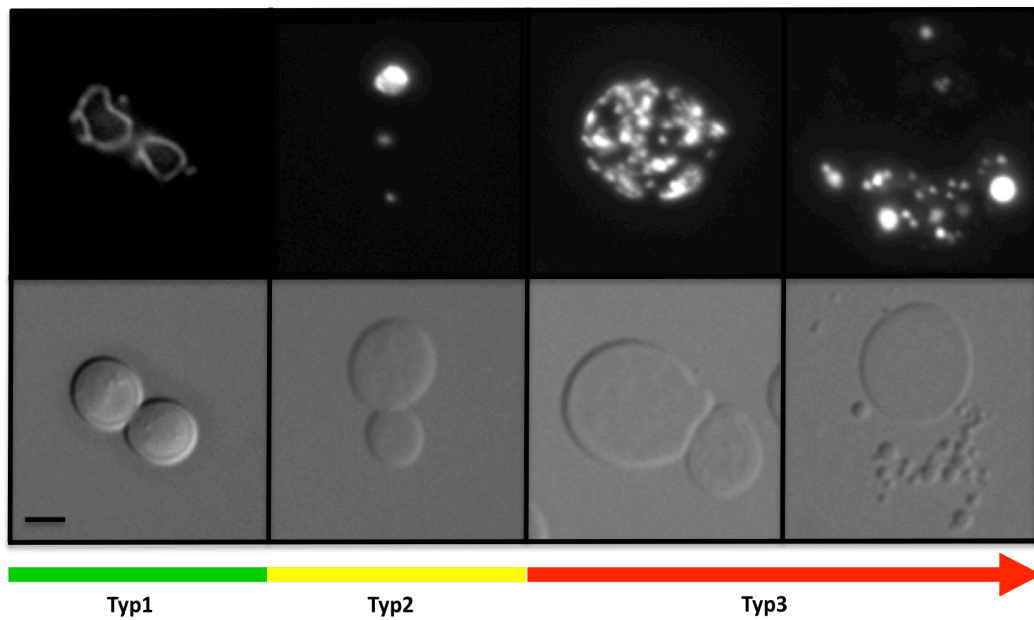
**Abb. 3.11 Test auf Wiederwachstum nach Einzelinkubation.** WT- und  $\Delta yca1$ -Zellen wurden jeweils in Sporulationsflüssigmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Zellen auf YPD-Platten ausplattiert und das Wiederwachstum anhand der gewachsenen Kolonien ermittelt. Es wurden je 100 Zellen ausplattiert.

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die  $\Delta yca1$ -Mutante womöglich von den wildtypischen Zellen in der Kultur profitiert. Um dies zu untersuchen, wurden die beiden Stämme einzeln in Sporulationsmedium inkubiert und auf Wiederwachstum getestet. Tatsächlich nahm die Überlebensrate der  $\Delta yca1$ -Mutante nach 13 Tagen stark ab und lag nach 18 Tagen bei 0%, wohingegen das Wiederwachstum des Wildtyps auch nach 18 Tagen noch knapp 70% betrug (Abb. 3.11).

Der Anstieg der Überlebensrate der  $\Delta yca1$ -Mutante bis zum 11. Tag ist vermutlich auf den gleichen Grund zurückzuführen, der auch in den durchgeführten Wettbewerbsexperimenten zu einem kurzfristigen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp führte (Abb. 3.8): Aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Apoptose bleiben zunächst vermehrt beschädigte Zellen in der Kultur, die evtl. noch in der Lage sind Kolonien zu bilden. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung der Mitochondrien fiel auf, dass die Organellen in den  $\Delta yca1$ -Zellen bereits nach 4 Tagen zum Großteil stark aggregiert vorlagen, wohingegen dieser Phänotyp bei den wildtypischen Zellen erst nach 15 Tagen auftrat (Abb. 3.12 A und B). Bei Einzelkulturen war die Stabilität der Zellwand der  $\Delta yca1$ -Mutante nach 13 Tagen vermutlich so stark herabgesetzt, dass die Zellen während der mikroskopischen Untersuchungen platzten (Abb. 3.12 A u. B). Platzende WT-Zellen konnten hingegen auch nach 18 Tagen nicht beobachtet werden (Abb. 3.12 B).

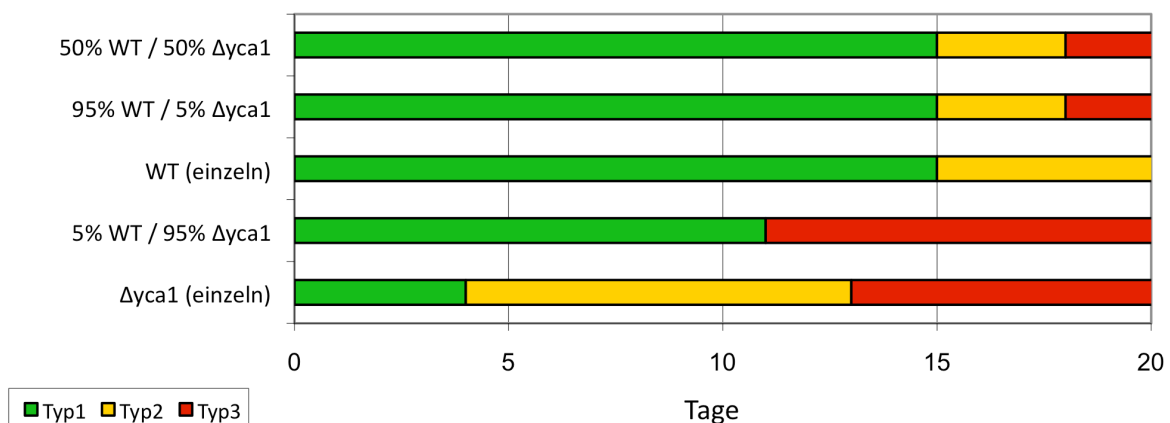
Bei Inkubation mit 95%  $\Delta yca1$ -Zellen und 5% WT-Zellen waren bereits nach 11 Tagen platzende  $\Delta yca1$ -Zellen zu sehen, was die Ergebnisse der Wachstumsexperimente bestätigt (Abb. 3.10 C). Bei einem Anteil von 50% WT oder mehr in der Hefekultur konnte die Zellintegrität der  $\Delta yca1$ -Mutante länger aufrechterhalten werden (Abb. 3.12 B), was ebenfalls die Ergebnisse aus den Wachstumsexperimenten stützt (Abb. 3.10 A). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Apoptose einen entscheidenden Vorteil beim langfristigen Überleben einer Hefekultur unter Hungerbedingungen bringt. Außerdem zeigen die Daten klar, dass Zellen vom programmierten Zelltod anderer Zellen profitieren können, was im Fall der  $\Delta yca1$ -Mutante zu einer Verlängerung der chronologischen Lebensspanne führt. Somit scheint es bei gleichzeitiger Inkubation von  $\Delta yca1$ -Mutante und Wildtyp nicht wirklich zu einer Konkurrenz zu kommen. Stattdessen profitieren alle Zellen in der Kultur von den Nährstoffen, die durch den programmierten Zelltod einiger Zellen freigesetzt werden.

**A**



**B**

**Inkubation in Sporulations-Flüssigmedium**



**Abb. 3.12 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach Inkubation in Sporulationsflüssigmedium.** WT-Zellen, die mitochondrial lokalisiertes GFP exprimieren und  $\Delta yca1$ -Zellen, die mitochondrial lokalisiertes RFP exprimieren, wurden in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen sowie einzeln in Sporulationsflüssigmedium inkubiert. An jedem Tag wurden Proben entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (A) Beobachtete Typen (oben: Fluoreszenzaufnahme, unten: DIC, Größenmaßstab: 2  $\mu$ m). Typ1: wildtypische Mitochondrien (links), Typ2: aggregierte Mitochondrien (Mitte), Typ3: geplatzte Zellen (rechts). Beim Wildtyp waren zu keinem Zeitpunkt und in keinem Mischungsverhältnis Zellen des Typs 3 zu beobachten. (B) Graphische Darstellung der beobachteten Typen. Die grünen Balken spiegeln den Zeitraum wider, in dem ausschließlich Zellen des Typs 1 beobachtet wurden. Je nach Mischung traten nach einigen Tagen zusätzlich Zellen des Typs 2 auf. Ab Beginn der Roten Balken waren auch Zellen des Typs 3 zu beobachten.



### 3.4 Nährstoffmangel führt in Fusionsmutanten zu einem Wachstumsdefekt und zur Aktivierung des programmierten Zelltodes

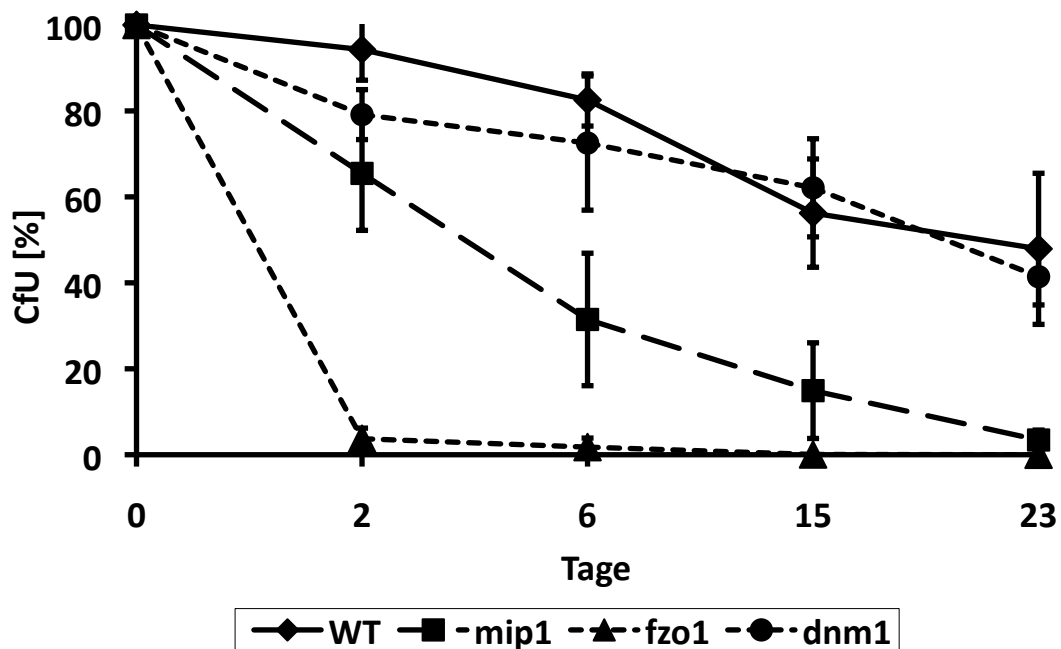
Hefezellen besitzen die Möglichkeit, bei fehlender Nährstoffzufuhr zu überleben, indem sie durch den Verdau von eigenen Zellkomponenten mittels Autophagozytose die Bereitstellung von Energie und Nährstoffen für lebenswichtige Funktionen gewährleisten (Cebollero und Reggiori, 2009). Mitochondrien können dabei als wichtige Nährstoff- und Energiequelle dienen, da sie mittels Autophagie oder der speziellen Mitophagie in der Vakuole abgebaut werden können (Kissova *et al.*, 2007; Kanki und Klionsky, 2008). Inwieweit dabei die mitochondriale Morphologie und Dynamik eine Rolle spielt, ist nicht eindeutig geklärt. In den folgenden Experimenten wurden mitochondriale Morphologiemutanten unter Nährstoffmangel untersucht, um die Rolle der Mitochondrien bei diesen Prozessen näher zu bestimmen.

#### 3.4.1 Das Wiederwachstum von hungrigen Fusionsmutanten ist beeinträchtigt

Um den Effekt von Nährstoffmangel auf die Überlebensfähigkeit von Hefezellen mit mitochondrialem Morphologiedefekt zu untersuchen, wurden die Fusionsmutante  $\Delta fzo1$  und die Teilungsmutante  $\Delta dnm1$  sowie eine Wildtyp- und die  $\rho^0$ -Kontrolle  $\Delta mip1$  für mehrere Tage auf Sporulationsplatten inkubiert. Der  $\Delta mip1$ -Mutante fehlt die katalytische Untereinheit der mitochondrialen DNA-Polymerase, was zu einem Verlust der mtDNA führt. Da mitochondriale Fusionsmutanten, und somit auch die  $\Delta fzo1$ -Mutante, über mehrere Generationen ihre mtDNA komplett verlieren, dient  $\Delta mip1$  als Kontrolle für die  $\Delta fzo1$ -Mutante. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde das Wiederwachstum der Zellen überprüft. Dazu wurde Zellmaterial von den Platten entnommen, mittels Zählkammer die Zellzahl bestimmt und 500 Zellen auf eine YPD-Platte ausplattiert. Nach einigen Tagen wurde die Anzahl der CfU (Colony forming Units) bestimmt, d.h. die Zahl der Zellen, die in der Lage waren, eine Kolonie zu bilden. Das Wiederwachstum wurde nach 2, 6, 15 und 23 Tagen Inkubation auf Hungermedium ermittelt.

Der Wildtyp und die  $\Delta dnm1$ -Mutante hatten ein ähnlich gutes Wiederwachstum. Die wildtypischen Zellen konnten nach 23 Tagen noch zu 47,9% Kolonien bilden und Zellen mit  $\Delta dnm1$ -Mutation zu 41,4% (Abb. 3.13). Bei der  $\Delta mip1$ -Mutante ( $\rho^0$ -Kontrolle) waren nach 23 Tagen zwar nur noch 3,4% der Zellen in der Lage, Kolonien zu bilden. Allerdings lag der Anteil an CfU nach zwei Tagen noch bei 65,5% und nach 15 Tagen immerhin noch bei 14,9%

(Abb. 3.13). Dagegen waren die Zellen der  $\Delta fzo1$ -Mutante bereits nach zwei Tagen fast nicht mehr in der Lage, wieder zu Kolonien hoch zu wachsen. Der Anteil an CfU betrug nach zwei Tagen lediglich 3,7% (Abb. 3.13). Diese Ergebnisse zeigen, dass die mitochondriale Fusion eine wichtige Rolle beim Überleben von Hefezellen unter Hungerbedingungen spielt.

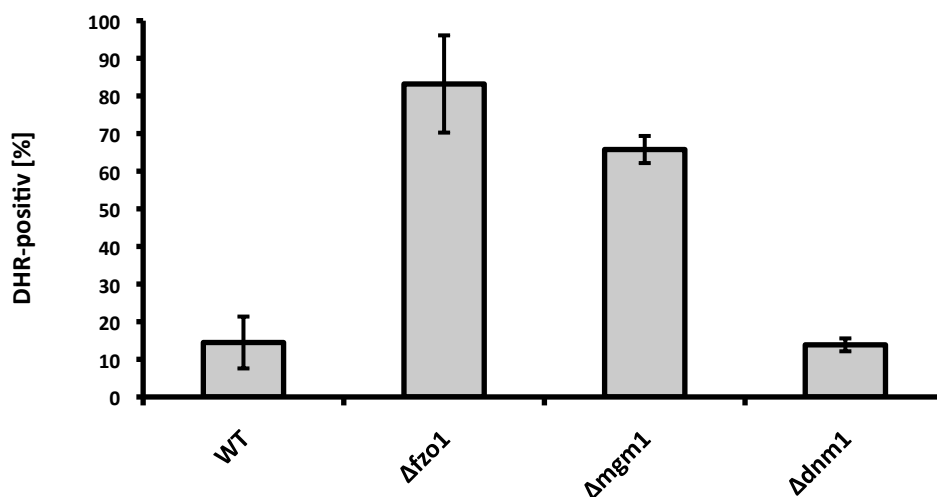


**Abb. 3.13 Untersuchung des Wiederwachstums nach Inkubation unter Hungerbedingungen.** WT-,  $\Delta fzo1$ -,  $\Delta mip1$ - und  $\Delta dnm1$ -Zellen wurden für mehrere Tage auf Sporulationsplatten (Hungermedium) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Zellen von den Platten entnommen, in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf YPD-Medium ausplattiert, um das Wiederwachstum zu bestimmen. Die Datenpunkte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Messungen.

### 3.4.2 Fusionsmutanten aktivieren bei Nährstoffmangel das apoptotische Programm

Eine erhöhte ROS-Konzentration gilt als Aktivator des programmierten Zelltodes und hat damit Auswirkungen auf die Lebensdauer der Zellen (Schulz *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 1999). Herker *et al.* (2004) konnten bereits zeigen, dass chronologisch und replikativ gealterte Hefezellen ROS akkumulieren. Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die geringe Überlebensrate der  $\Delta fzo1$ -Mutante (Kap. 3.4.1) mit einer erhöhten Apoptoserate einher geht. Zur Messung von intrazellulären ROS-Konzentrationen wurden die Fusionsmutanten  $\Delta fzo1$  und  $\Delta mgm1$  sowie der Wildtyp und die Teilungsmutante  $\Delta dnm1$  vier Tage auf Platten

mit Hungermedium (Sporulationsmedium) inkubiert und die Zellen anschließend mit Dihydrorhodamin-123 (DHR) gefärbt. Der Anteil an ROS-positiven  $\Delta mgm1$ -Zellen lag bei 65,8%. Bei der  $\Delta fzo1$ -Mutante waren es 83,2%. Dagegen hatten lediglich 14,5% der wildtypischen Zellen und 13,9% der  $\Delta dnm1$ -Zellen eine erhöhte ROS-Konzentration (Abb. 3.14). Die Ergebnisse bestätigen frühere Beobachtungen, nach denen die  $\Delta fzo1$ -Mutante nach Inkubation auf Sporulationsplatten einen wesentlich höheren Anteil an apoptotischen Zellen aufwies als der Wildtyp oder die Teilungsmutante  $\Delta dnm1$ . Die damaligen Untersuchungen konnten zeigen, dass die  $\Delta fzo1$ -Mutante einen wesentlich höheren Anteil an TUNEL-positiven Zellen aufwies als der Wildtyp oder die  $\Delta dnm1$ -Mutante (Brede, 2007). Scheinbar sind Zellen mit blockierter mitochondrialer Fusion nicht in der Lage unter Nährstoffmangel zu überleben und aktivieren verstärkt das apoptotische Programm um den überlebenden Zellen Nährstoffe zur Verfügung stellen zu können.



**Abb. 3.14 Bestimmung der ROS-Konzentration nach Inkubation unter Nährstoffmangel.** WT-,  $\Delta fzo1$ -,  $\Delta mgm1$ - und  $\Delta dnm1$ -Zellen wurden für mehrere Tage auf Sporulationsplatten (Hungermedium) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend von den Platten gekratzt, in YPD-Medium resuspendiert und mit DHR angefärbt, um die Bildung von ROS sichtbar zu machen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

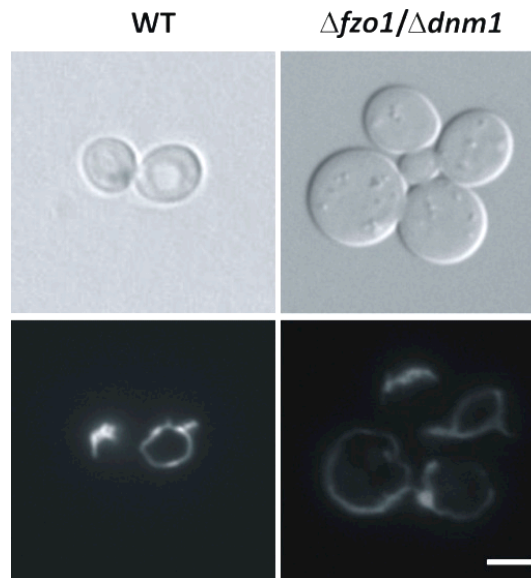
### 3.5 Die mitochondriale Dynamik beeinflusst die replikative Alterung in *S. cerevisiae*

Über die Auswirkungen von Defekten der mitochondrialen Morphologie auf das Alter von Hefezellen ist sehr wenig bekannt. Die Deletion des Gens *DNM1*, einer Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie, führt zu einer verlängerten chronologischen Lebensspanne und zu erhöhter Fitness gegenüber wildtypischen Zellen (Scheckhuber *et al.*, 2007). Zu Untersuchungen mit anderen Morphologiemutanten in Alterungsexperimenten, speziell mit mitochondrialen Fusionsmutanten, wurden bis heute keine Daten veröffentlicht. Auch über den Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dynamik und dem replikativen Alter von Hefezellen ist wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten replikativ gealterte Zellen einer mitochondrialen Fusions- und Teilungs-Doppelmutante untersucht.

#### 3.5.1 Die $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante besitzt ein wildtypisches mitochondriales Netzwerk

Für die Untersuchung der Auswirkungen von mitochondrialen Morphologiedefekten auf das replikative Alter von Hefezellen wurde eine  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante hergestellt. Bei der Erzeugung dieser Doppelmutante ist die Reihenfolge der eingefügten Mutationen ausschlaggebend für den mitochondrialen Phänotyp. Wird in einer  $\Delta fzo1$ -Mutante mit mitochondrialem Fusionsdefekt nachträglich das *DNM1*-Gen deletiert, sodass auch die mitochondriale Teilung blockiert wird, bleibt in einem Großteil der Zellen der mitochondriale Phänotyp der Fusionsmutante erhalten, da die bereits fragmentierten Mitochondrien nicht mehr fusionieren können. Andererseits kann die Bildung eines engmaschigen mitochondrialen Netzes in der  $\Delta dnm1$ -Mutante durch die nachfolgende Mutation des *FZO1*-Gens ebenfalls nicht mehr rückgängig gemacht werden (Sesaki und Jensen, 1999). Daher wurde die in dieser Arbeit verwendete Doppelmutante durch Sporulation mit anschließender Tetradendisektion hergestellt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass zunächst durch Paarung der Einzelmутanten diploide Zellen entstehen, die jeweils das mutierte und das wildtypische Allel besitzen und somit ein wildtypisches mitochondriales Netzwerk besitzen. Anschließend werden die diploiden Zellen auf Sporulationsmedium inkubiert. Die entstandenen Sporen können auf Vollmedium zu haploiden Kolonien heranwachsen. Dabei kann es sich um wildtypische Zellen, Einzelmутanten oder Doppelmutanten handeln.

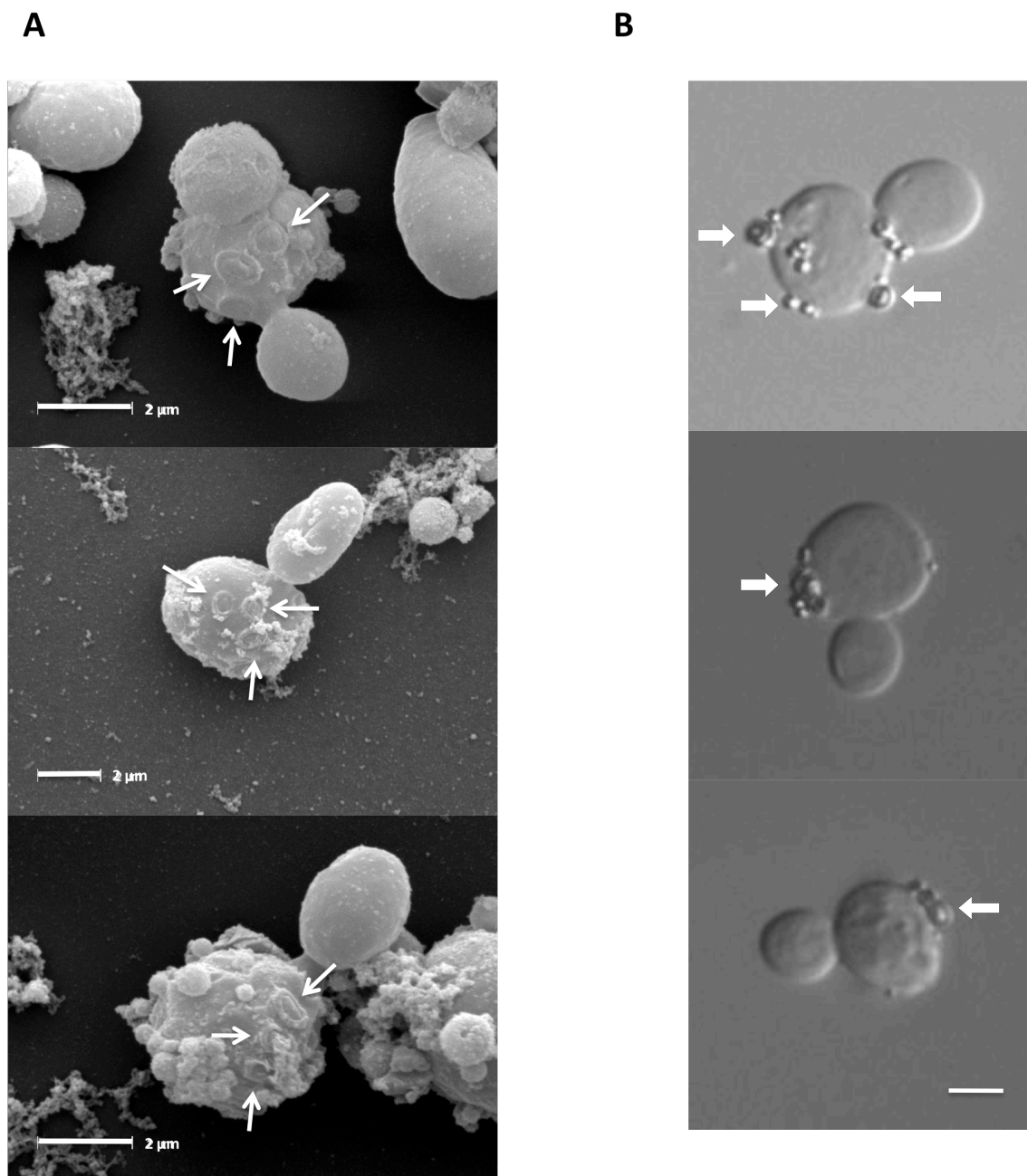
Entscheidend ist dabei, dass die haploide Doppelmutante aus einer diploiden Zelle mit wildtypischem mitochondrialen Netzwerk entstanden ist. Da nun keine aktive mitochondriale Fusion und Teilung mehr stattfinden kann, bleibt das Netzwerk wildtypisch (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 Mitochondriale Morphologie nach gleichzeitiger Deletion von *FZO1* und *DNM1*.** WT und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und anschließend mit Rhodamin-B-Hexylester gefärbt, um die Mitochondrien fluorezenzmikroskopisch sichtbar zu machen (Fluoreszenz: unten, DIC: oben). Größenmaßstab, 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.2 Replikativ gealterte Zellen mit mitochondrialem Morphologiedefekt haben ein verzögertes Wachstum

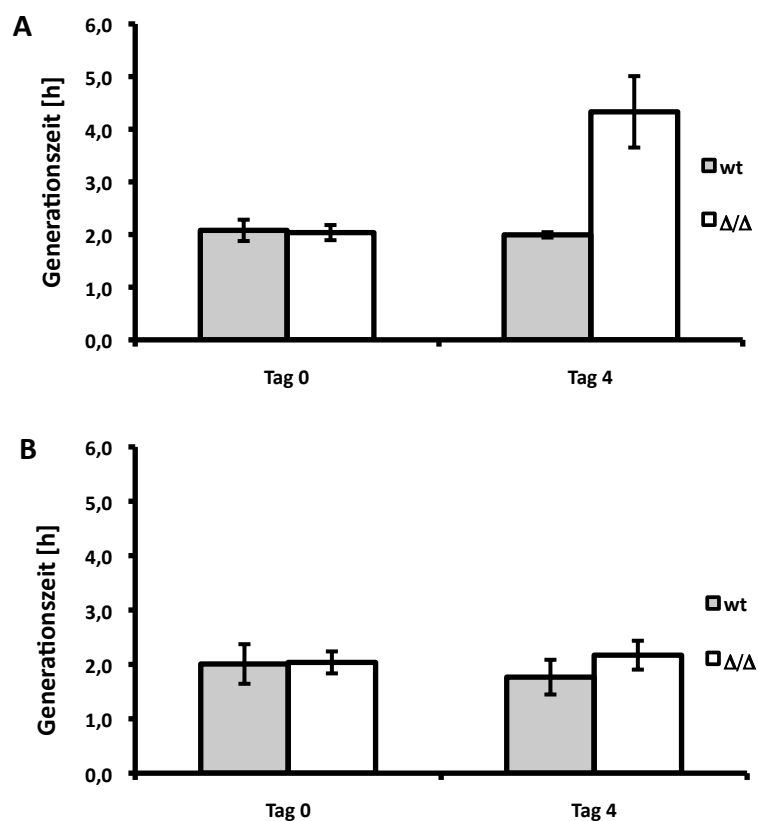
Neben dem Einfluss der mitochondrialen Morphologie auf das chronologische Alter von Hefezellen sollten in dieser Arbeit auch eventuelle Auswirkungen auf die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden replikativ gealterte Hefezellen isoliert. Dazu wurden wildtypische Zellen und Zellen mit  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutation biotinyliert und mit Hilfe von Streptavidinummantelten Magnetkügelchen von jungen Zellen getrennt. Bei dieser Art der Aufreinigung ist entscheidend, dass nur die Zellen der ersten Generation biotinyliert sind und damit isoliert werden. Das ist möglich, weil beim Knospungsvorgang neues Zellwandmaterial gebildet wird und die Magnetkügelchen somit nur an die alten, biotinylierten Mutterzellen binden (Abb. 3.16 A und B).



**Abb. 3.16 Mikroskopische Aufnahmen von aufgereinigten Mutterzellen.** Nur Mutterzellen binden Streptavidinummantelte Magnetkügelchen. Die Knospen/Tochterzellen sind unmarkiert. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von knospenden Hefezellen nach der Anbindung von Streptavidinummantelten Magnetkügelchen. Die Mutterzellen besitzen mehrere Knospungsnarben (schmale Pfeile). (B) Lichtmikroskopische Aufnahme von Hefezellen. Magnetkügelchen sind nur an den größeren Mutterzellen zu beobachten (dicke Pfeile). Größenstandard, 2 μm.

Die Aufreinigung wurde zweimal wiederholt, um Zellen mit hohem replikativen Alter zu erhalten (ca. 20-24 Knospungen). Nach jeder Aufreinigung wurden die Zellen in frischem Medium inokuliert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die

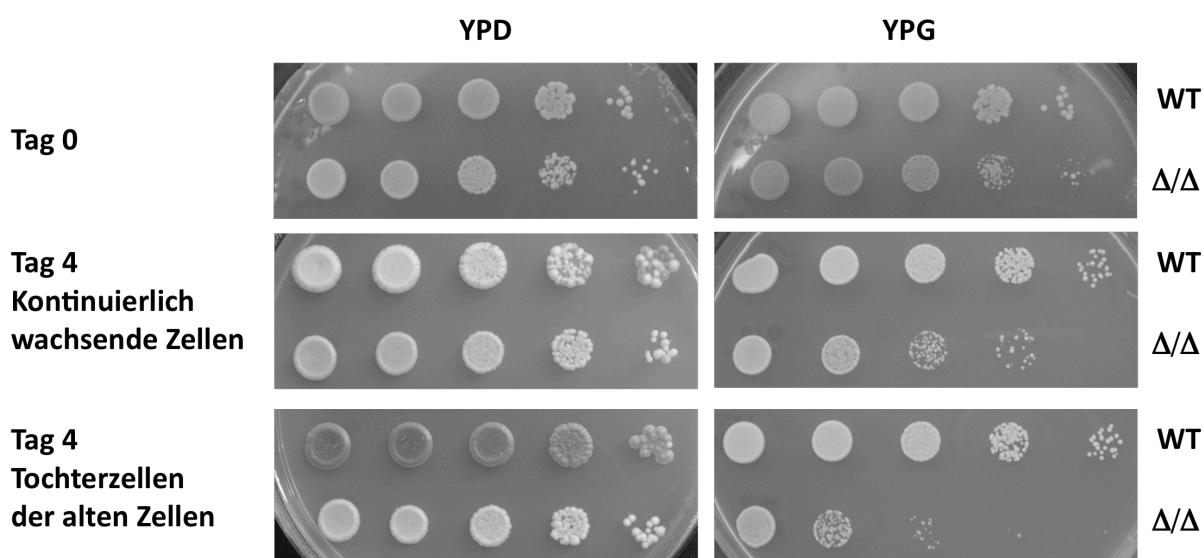
Generationszeit der Kulturen bestimmt. Dabei konnte interessanterweise beobachtet werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kulturen mit zunehmendem Alter der Mutterzellen stark abnahm. Nach vier Tagen (das replikative Alter der Mutterzellen betrug ca. 20 Generationen) war die Generationszeit der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur mit 4,33 h sogar mehr als doppelt so hoch wie die der wildtypischen Kultur (2,03 h, Abb. 3.17 A). Dabei ist zu beachten, dass die untersuchten Kulturen zu ca. 99% aus jungen Tochterzellen bestanden, da sich die Kultur nach Inkubation über Nacht in logarithmischer Wachstumsphase befand. In kontinuierlich verdünnten Hefekulturen werden grundsätzlich gesunde Tochterzellen mit normalem Wachstumsverhalten gebildet, auch wenn diese von alten Mutterzellen abstammen (Laun *et al.*, 2007). Dementsprechend war das Wachstum der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante in kontinuierlich verdünnter Kultur zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt (Abb. 3.17 B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Tochterzellen den Wachstumsdefekt von den aufgereinigten  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutterzellen geerbt haben.



**Abb. 3.17 Wachstumsgeschwindigkeit der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante.** (A) WT- und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutterzellen wurden aufgereinigt und danach wieder in frisches YPD-Medium inokuliert. Die entstandene  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur hatte nach drei Aufreinigungsschritten eine stark verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit. (B) WT und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante wurden regelmäßig in frisches YPD-Medium überführt, um kontinuierlich wachsende Kulturen zu

erhalten. Das Wachstum der Doppelmutante war hier nicht eingeschränkt. Die Untersuchungen wurden dreimal wiederholt.  $\Delta/\Delta$ :  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante.

Ein Drop-Dilution Test, bei dem eine Verdünnungsreihe der Zellkulturen auf YPD-Platten getropft wurde, konnte zeigen, dass die Doppelmutante bei Wachstum auf YPD-Medium keinen generellen Wachstumsdefekt besitzt (Abb. 3.18). Das bedeutet, dass nur die Wachstumsgeschwindigkeit und somit die Fitness der Zellen verringert war, nicht aber deren generelle Fähigkeit zum Wiederwachstum. Der gleiche Test mit YPG-Platten (Wachstum nur bei respiratorischer Kompetenz möglich) zeigte, dass die  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen unter diesen Bedingungen einen starken Wachstumsdefekt besitzen (Abb. 3.18).

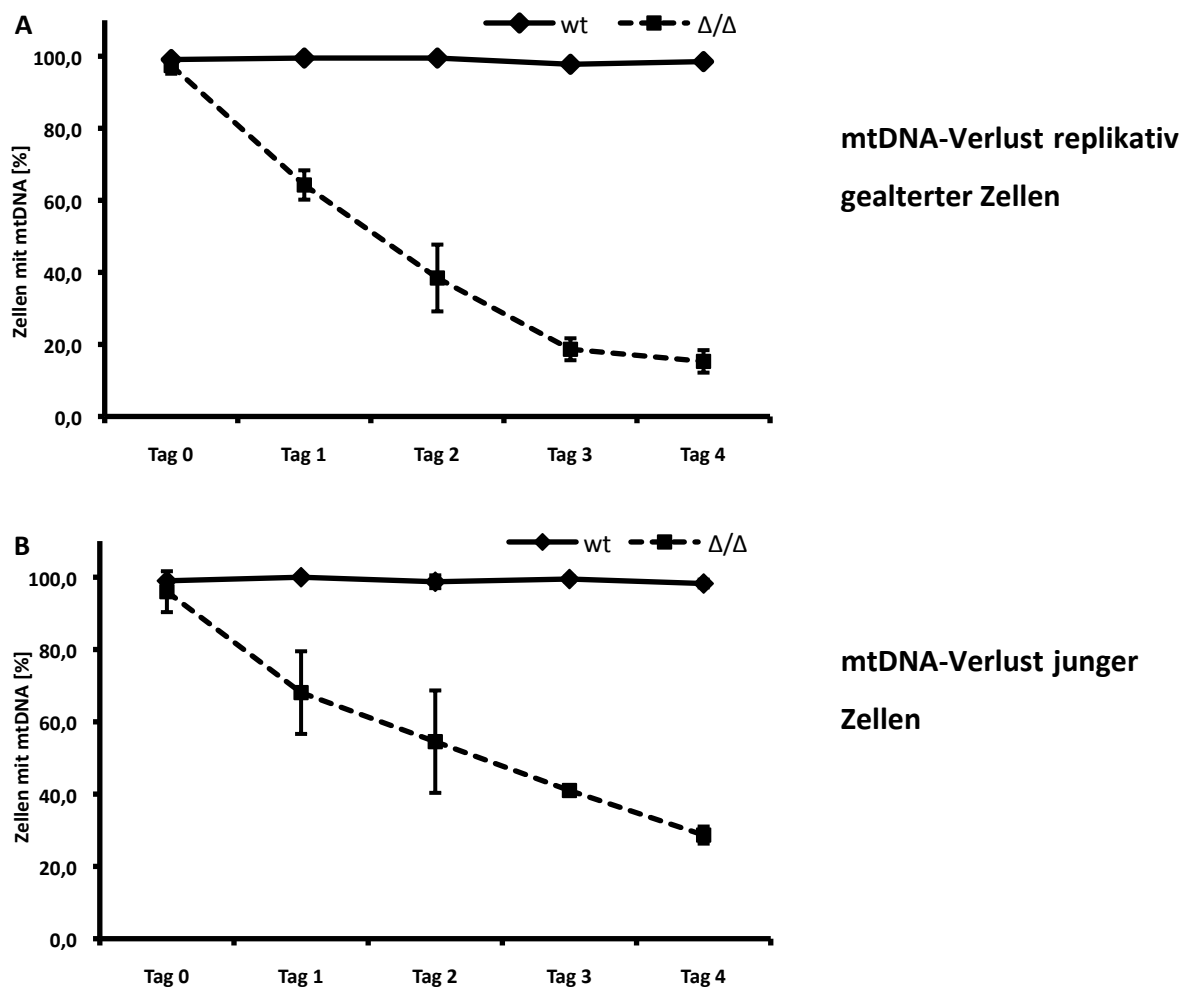


**Abb. 3.18 Drop-Dilution Test zur Untersuchung von Wachstumsdefekten.** Von einer WT- und einer  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und je 5  $\mu$ l Zellsuspension auf eine YPD- und eine YPG-Platte getropft. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend ausgewertet. Kontinuierlich wachsende Zellen: Die Hefekulturen wurden jeden Tag in frisches YPD-Medium überführt. Tochterzellen der alten Zellen: Die Mutterzellen wurden nach der dritten Aufreinigung in frischem YPD-Medium inokuliert und über Nacht inkubiert. Die entstandene Kultur bestand zu 99% aus jungen Tochterzellen (logarithmische Wachstumsphase).  $\Delta/\Delta$ :  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante.

Um zu überprüfen, ob der Wachstumsdefekt auf einen Verlust von mitochondrialer DNA zurück zu führen ist, wurden die Zellen mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei war zu beobachten, dass nach zwei Tagen nur noch ca. 38% der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen, die aus den isolierten Mutterzellen hervorgingen, mtDNA besaßen und nach vier Tagen sogar nur noch ca. 15% (Abb. 3.19 A). Zur Kontrolle wurden DAPI-Färbungen und ein Drop-Dilution-Test mit kontinuierlich wachsenden wildtypischen und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -

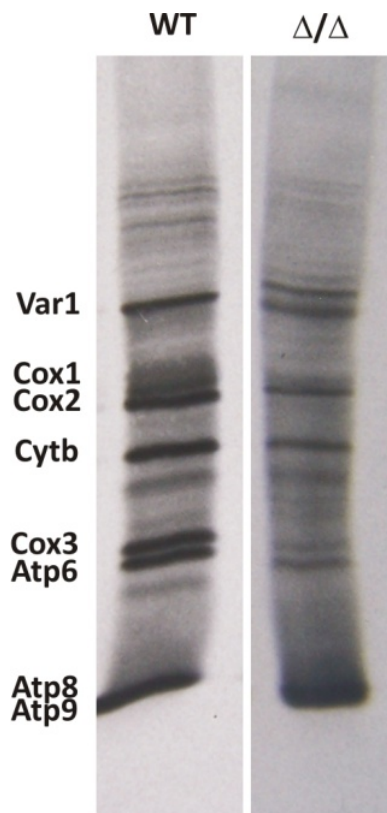


Kulturen durchgeführt. Auch hier konnte ein starker mtDNA-Verlust bei  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen beobachtet werden. Nach zwei Tagen besaßen nur noch ca. 50% der Zellen mtDNA. Nach vier Tagen waren es nur noch ca. 30% (Abb. 3.19 B). Das Wachstum der kontinuierlich wachsenden  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur war auf YPD nicht eingeschränkt. Lediglich auf YPG war ein leichter Wachstumsdefekt zu beobachten, was den Verlust von mtDNA bestätigt (Abb. 3.18). Die Wachstumsgeschwindigkeit der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur war auch noch nach mehrtägiger Inkubation identisch mit derjenigen der wildtypischen Kultur (Abb. 3.17 B).



**Abb. 3.19 Verlust von mtDNA in der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante.** Aus den logarithmisch wachsenden Kulturen wurden Aliquots entnommen und die mtDNA mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Es wurden jeweils ca. 200 Zellen ausgezählt. (A) WT- und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutterzellen wurden mehrmals aufgereinigt, danach wieder in frisches YPD-Medium inokuliert, über Nacht inkubiert und anschließend mit DAPI gefärbt. (B) WT und  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante wurden regelmäßig in frisches YPD-Medium überführt, um kontinuierlich wachsende Kulturen zu erhalten. Die DAPI-Färbung erfolgte ebenfalls mit Kulturen nach Inkubation über Nacht. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der drei Messungen.

Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der Verlust mitochondrialer DNA keine Auswirkung auf die Fitness der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante bei Wachstum auf glukosehaltigem Medium hat. Um einen Einblick in andere mögliche Ursachen für den Fitnessverlust der Tochterzellen der replikativ gealterten  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen zu erhalten, wurde das mitochondriale Genexpressionsmuster mittels *in vivo* Translation untersucht. Dabei konnte keine Beeinträchtigung der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante beobachtet werden. Alle mitochondrial codierten Proteine wurden auch in stark gealterten  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen exprimiert (Abb. 3.20). Lediglich die Intensität des Bandenmusters war in der Doppelmutante schwächer ausgeprägt als im Wildtyp (Abb. 3.20). Vermutlich liegt dies am Verlust von mtDNA in einem Teil der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen (Abb. 3.19 A).



**Abb. 3.20 Nachweis von mitochondrial codierten Proteinen.** Mitochondrial codierte Proteine wurden mittels *in vivo* Translation radioaktiv synthetisiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Das Bandenmuster wurde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zu sehen sind die Proteinbanden von Var1, Cox1, Cox2, Cytb, Cox3, Atp6, Atp8 und Atp9. Untersucht wurden Zellkulturen, die aus aufgereinigten replikativ gealterten Mutterzellen nach drei Aufreinigungen hervorgingen und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (WT links,  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante rechts). Die Gelausschnitte sind von unterschiedlichen Stellen des gleichen Gels.

Auch wenn kein klarer Hinweis auf die Ursache für den Fitnessverlust der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen gefunden werden konnte, muss es einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dynamik und dem replikativen Alter von Hefezellen geben. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass mitochondriale Teilung und Fusion wichtig für zelluläre Abläufe bei der replikativen Alterung in *S. cerevisiae* sind.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Mfb1 ist mitochondrial lokalisiert und reguliert die mitochondriale Morphologie

In der Hefe *S. cerevisiae* sind Mfb1 und Mdm30 die einzigen F-Box Proteine, die an der Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. Die Untersuchung von Mutanten aller anderen F-Box Proteine zeigte, dass diese keine Funktion bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie ausüben. Diese Beobachtungen wurden durch Lokalisationsstudien (Huh *et al.*, 2003) und durch die Analyse des mitochondrialen Proteoms (Sickmann *et al.*, 2003) bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass außer Mfb1 und Mdm30 keines der anderen F-Box Proteine mitochondrial lokalisiert ist. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass beide F-Box Proteine unterschiedliche Funktionen bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie ausüben. Welche Funktion Mfb1 genau wahrnimmt und mit welchen Zielproteinen es interagiert, ist nicht geklärt. In Massenspektrometrie- und Co-Immunopräzipitationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mfb1 mit Skp1, einer Untereinheit des SCF-Komplexes, interagiert (Kondo-Okamoto *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2002). Allerdings konnte der mitochondriale Phänotyp der  $\Delta mfb1$ -Mutante nicht durch Deletion der Untereinheiten des SCF-Komplexes oder des Proteasoms imitiert werden (Dürr *et al.*, 2006). Zudem zeigten die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass das F-Box Motiv sowohl von Mfb1 als auch von Mdm30 nicht essentiell für die Aufrechterhaltung des wildtypischen mitochondrialen Phänotyps ist. Auch wenn Mdm30 als Untereinheit des SCF-Komplexes den Abbau von Fzo1 reguliert (Cohen *et al.*, 2008) und F-Box Proteine häufig als Untereinheiten von SCF-Komplexen agieren, muss das nicht zwangsläufig auf Mfb1 zutreffen. Eine von SCF-Komplex und Proteasom unabhängige Funktion von F-Box Proteinen konnte bereits im Fall des Proteins Rcy1 nachgewiesen werden, welches an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt ist (Galan *et al.*, 2001). In mitotisch wachsenden  $\Delta mfb1$ -Zellen wurde zwar ein mitochondrialer Effekt beobachtet, jedoch kann es sich hierbei auch um einen Folgeeffekt handeln, der durch die eher zellstadienspezifische Funktion von Mfb1 hervorgehen könnte. Dafür spricht die Beobachtung, dass das Gen *MFB1* neben *MDM30* während der Sporulation in Hefe verstärkt exprimiert wird (Chu *et al.*, 1998). Zudem konnten Kondo-Okamoto *et al.* (2006) zeigen, dass Mfb1 während der Knospung vermehrt in der Mutterzelle lokalisiert ist

und die Lokalisation vom F-Box Motiv abhängig ist. Damit zeigt sich, dass das mitochondriale F-Box Protein Mfb1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie sowie der zellulären Entwicklung spielt.

#### **4.2 Die Deletion von *MDM30* führt zur Bildung von mitochondrialen Fusionsintermediaten**

Die primäre Funktion von Mdm30 ist vermutlich die Regulation des zellulären Proteinlevels des mitochondrialen Fusionsproteins Fzo1, wobei die Deletion des Gens *MDM30* zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration von Fzo1 führt (Fritz *et al.*, 2003). Da Zellen mit deletiertem *MDM30*-Gen genauso wie Zellen, in denen das Gen *FZO1* überexprimiert wird, bei Wachstum auf glukosehaltigem Medium mitochondriale Aggregate bilden, wurde vorgeschlagen, dass überschüssiges Fzo1 an der Oberfläche der Mitochondrien zu unproduktiven mitochondrialen Fusionsintermediaten führt (Dürr *et al.*, 2006; Merz *et al.*, 2007). In Säugerzellen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Überexpression von Mitofusinen (Säugerhomologa von Fzo1) zur Aggregation der Mitochondrien führt (Rojo *et al.*, 2002; Santel *et al.*, 2003). Jedoch konnten die Intermediate nicht direkt nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit zeigen, dass die Mitochondrien in Zellen mit deletiertem Mdm30 in sehr engem Kontakt zueinander stehen. Zusätzlich befindet sich elektronendichtes Material an den Berührungspunkten der Mitochondrien (Abb. 3.3 C). Bei Betrachtung der dreidimensionalen Rekonstruktionen, sieht man, dass die einzelnen mitochondrialen Fragmente zwar in Aggregaten vorliegen, aber nicht miteinander fusionieren (Abb. 3.3 A). Diese Beobachtungen könnten die ersten direkten Hinweise auf die Existenz der mitochondrialen Fusionsintermediate darstellen. Zusätzliche Untersuchungen wie die elektronenmikroskopische Analyse von *FZO1*-überexprimierenden Zellen sowie Immunelektronenmikroskopie zur Überprüfung des elektronendichten Materials könnten eventuell weitere wichtige Hinweise liefern.

### **4.3 Die mitochondriale Fusion ist wichtig für die Sporulation in *S. cerevisiae***

In den Untersuchungen zur Sporulation in mitochondrialen Morphologiemutanten konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal der Effekt der Fehlregulierung der mitochondrialen Dynamik auf die zelluläre Entwicklung in einem speziellen Zellstadium in Hefe beobachtet werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Fusion wichtig für den Übergang von Hefezellen in die Sporulationsphase ist und eine Blockade zur Verringerung der Sporulationseffizienz führt (Abb. 3.6).

Bis heute konnten in vielen Studien eine Reihe von Effekten in unterschiedlichen Spezies beobachtet werden, die mit der mitochondrialen Fusion und Teilung zusammenhängen. In Hefe konnte gezeigt werden, dass die Blockade der mitochondrialen Fusion zum Verlust von mtDNA führt, was eine respiratorische Inkompetenz bewirkt (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Die Deletion der mitochondrialen Teilungskomponente Dnm1 in Hefe hat hingegen eine erhöhte chronologische Lebensspanne und eine verbesserte Fitness der Zellen zur Folge (Scheckhuber *et al.*, 2007). In Säugern führen Defekte in mitochondrialen Teilungs- und Fusionsprozessen zu schweren neurodegenerativen Erkrankungen (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2004; Zuchner *et al.*, 2006). Auch auf wichtige zelluläre Ereignisse wie den programmierten Zelltod haben mitochondriale Teilungs- und Fusionskomponenten Einfluss (Fannjiang *et al.*, 2004; Alirol *et al.*, 2006; Frezza *et al.*, 2006). Diese Beispiele beschreiben entweder direkte Effekte gestörter mitochondrialer Teilung bzw. Fusion auf einzelne zelluläre Prozesse oder Folgen von Mutationen in Form von Erkrankungen. Untersuchungen zu Effekten auf die zelluläre Entwicklung und auf spezielle Entwicklungsstadien beschränken sich auf Beobachtungen von embryonaler Letalität (Labrousse *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003) oder auf die Spermatogenese (Hales und Fuller, 1997; Honda und Hirose, 2003). Untersuchungen, in denen die Auswirkungen der gestörten mitochondrialen Morphologie auf einzelne Zellstadien näher betrachtet wurden, sind jedoch kaum vorhanden. Gorsich und Shaw (2004) untersuchten in Hefe mitochondriale Teilungsmutanten sowie Teilungs- und Fusionsdoppelmutanten während der einzelnen Sporulationsphasen. Sie konnten zeigen, dass in den untersuchten Mutanten der Anteil an Sporen ohne Mitochondrien gegenüber wildtypischen Zellen erhöht war. Aufgrund des mitochondrialen Vererbungsdefekts waren die Sporen nicht überlebensfähig. Die Autoren vermuteten, dass dieser Effekt auf der Tatsache beruht, dass in den Mutanten die Mitochondrien aggregiert vorlagen, was eine

gleichmäßige Vererbung eventuell verhinderte. Auch in dieser Arbeit konnte anhand der Untersuchungen mit  $\Delta mdm30$ -Zellen ein mitochondrialer Vererbungsdefekt in einer Morphologiemutante beobachtet werden (Abb. 3.6). Gleichzeitig war auch hier die Anzahl an überlebensfähigen Sporen gegenüber dem Wildtyp verringert. Es konnte allerdings zusätzlich gezeigt werden, dass der Übergang der  $\Delta mdm30$ -Zellen von der stationären Phase zur Bildung der frühen Tetraden gestört war (Die Sporulationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp um 70% reduziert; Abb. 3.6 C). Da in allen Stadien während der Sporulation in der  $\Delta mdm30$ -Mutante die Mitochondrien fragmentiert vorlagen und gleichmäßig in den Zellen verteilt waren, ist ein sekundärer mitochondrialer Vererbungsdefekt auszuschließen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder eine funktionierende mitochondriale Dynamik wichtig für die korrekt ablaufende Sporulation ist oder Mdm30 neben der Regulation der Fusionsaktivität von Fzo1 weitere zelluläre Funktionen ausübt. In verschiedenen Studien wurde bereits eine Funktion von Mdm30 als Transkriptionsaktivator sowie als Regulator für den Export von mRNA aus dem Nukleus beschrieben (Muratani *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2009). Auch wenn zumindest die Funktion als Transkriptionsaktivator umstritten ist, zeigen diese Beispiele und die Beobachtungen in dieser Arbeit, dass die Aufgaben der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine über die einfache Regulation der mitochondrialen Morphologie hinaus geht.

#### **4.4 Das langfristige Überleben einer Hefekultur ist abhängig vom programmierten Zelltod**

Die Notwendigkeit der Apoptose in *S. cerevisiae* ist umstritten, da sich die grundsätzliche Frage stellt, welchen Vorteil eine einzelne Hefezelle aus dem programmierten Zelltod ziehen könnte. Jedoch sollten Hefezellen bei dieser Fragestellung nicht als Ansammlung einzelner Individuen, sondern als Teil eines Kollektivs betrachtet werden. Bei einzelligen Organismen gibt es viele Hinweise auf Kollektivismus wie Quorum sensing oder die Bildung von Biofilmen (Fuqua *et al.*, 1994; Moons *et al.*, 2009). In Hefe wurden zudem extrazelluläre Substanzen identifiziert, die vermutlich eine Rolle bei der Kommunikation zwischen den Zellen spielen (Chen und Fink, 2006). Somit ist es denkbar, dass der programmierte Zelltod einzelner Hefezellen dem Überlebensvorteil der gesamten Kultur dient.

Die Experimente in dieser Arbeit konnten diese Vermutung bestätigen. Anhand der Untersuchungen mit der *Δyca1*-Mutante wurde gezeigt, dass eine Hefekultur, in der die einzelnen Zellen nicht apoptotisch sterben können, gegenüber einer wildtypischen Hefekultur einen Überlebens- und Wachstumsnachteil besitzt (Abb. 3.8, 3.11 und 3.12). Jedoch konnte ebenfalls beobachtet werden, dass Hefezellen mit blockierter Apoptose anscheinend von der Gegenwart wildtypischer Zellen in der Kultur profitieren können. Bei einem Mindestanteil von 50% WT-Zellen in einer Mischkultur mit *Δyca1*-Zellen war die Überlebensrate der Mutante stark erhöht im Vergleich zu Kulturen mit einem WT-Anteil von 5% oder weniger (Abb. 3.9, 3.10 und 3.12). Die Opferung einzelner wildtypischer Hefezellen diente dabei vermutlich der verbesserten Nährstoffversorgung der überlebenden Zellen in der Kultur und somit auch der *Δyca1*-Zellen. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass Hefezellen in der Lage sind, sich durch Apoptose für das Wohl der gesamten Kultur zu opfern, um die Überlebenschancen der restlichen Zellen zu verbessern. Der Tod einzelner Zellen könnte zum einen zu einer Verringerung der Konkurrenz um die verbliebenen Nährstoffe unter den überlebenden Hefezellen führen. Zudem dienen die Zellkomponenten der toten Zellen selbst als Nährstoffe (Fabrizio *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004). Es stellt sich die Frage, wie und warum die Apoptose nur in einzelnen Zellen aktiviert wird. Die Aktivierung könnte beispielsweise durch Signalstoffe erfolgen. Es wurde bereits gezeigt, dass das Hefepheromon  $\alpha$ -Faktor bei erfolgloser Paarung den programmierten Zelltod in Hefezellen einleiten kann (Severin und Hyman, 2002). In diesem Fall wird das Überleben diploider Hefezellen gefördert, was die genetische Diversität der Population erhöht (Büttner *et al.*, 2006). Auch Ammoniak dient als Signalstoff für die Regulation des programmierten Zelltodes in Hefekulturen (Vachova und Palkova, 2005). Generell sterben in hungernden Hefekulturen vermutlich bevorzugt alte und beschädigte Zellen, um die Überlebenschance der jungen und gesunden Zellen zu erhöhen. Ob dabei Signalstoffe notwendig sind oder ob das apoptotische Programm in diesen Zellen lediglich aufgrund ihres Alters und der akkumulierten Schäden aktiviert wird, ist nicht geklärt.



#### 4.5 Die mitochondriale Fusion ist entscheidend für das Überleben unter Nährstoffmangel

Unter Nährstoffmangel müssen Hefezellen die Autophagozytose aktivieren, um Energie für ihr Überleben zu gewinnen. Ist dieser Prozess blockiert, wie z.B. in Autophagiemutanten, besitzen die Zellen eine stark verkürzte chronologische Lebensspanne (Powers *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit untersuchte mitochondriale Fusionsmutante  $\Delta fzo1$  zeigte unter Hungerbedingungen ein ähnliches Verhalten wie Autophagiemutanten. Bereits nach zweitägiger Inkubation unter Nährstoffmangel waren die Zellen nicht mehr in der Lage, auf Vollmedium Kolonien zu bilden (Abb. 3.13). Beim Wildtyp hingegen betrug das Wiederwachstum auch nach 23-tägiger Hungerphase noch knapp 50% (Abb. 3.13). Zusätzlich war in der  $\Delta fzo1$ -Mutante unter Hungerbedingungen der zelluläre ROS-Spiegel stark erhöht (Abb. 3.14). Ein Grund für die geringen Überlebenschancen der Mutante könnte tatsächlich eine Blockade der Autophagozytose sein. In diesem Fall wären die Zellen nicht in der Lage durch den Verdau eigener Zellkomponenten wichtige Nährstoffe für das Überleben der Zelle zu produzieren. Ein anderer Grund für das beeinträchtigte Wiederwachstum der  $\Delta fzo1$ -Mutante könnte auch eine erhöhte Autophagozytoserate sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die mitochondriale Fusion den autophagozytotischen Abbau der Mitochondrien reguliert (Twig *et al.*, 2008a; Twig *et al.*, 2008b). Möglicherweise kann bei der Aktivierung des Autophagie-Programms aufgrund der starken Fragmentierung der Mitochondrien eine regulierte Autophagozytose der Organellen nicht mehr gewährleistet werden. Ein vollständiger Abbau der Mitochondrien würde unweigerlich zum Tod der Zellen führen, da die Organellen essentiell für eukaryotische Organismen sind. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von Hefezellen nach Inkubation unter Nährstoffmangel konnte beobachtet werden, dass schon nach zwei Tagen in mehr als 90% der untersuchten  $\Delta fzo1$ -Zellen keine Mitochondrien mehr zu beobachten waren (Brede, 2007). Die Organellen wurden vermutlich komplett in der Vakuole abgebaut, was das eingeschränkte Wiederwachstum der Mutante in den Untersuchungen in dieser Arbeit erklären würde. Inwieweit bei diesem Szenario eine erhöhte ROS-Konzentration, wie sie in der  $\Delta fzo1$ -Mutante beobachtet wurde, eine Rolle spielt, ist unklar. Um das Verhalten der Fusionsmutante unter Nährstoffmangel weiter untersuchen zu können, wäre die Konstruktion einer Fusions-/Autophagie-Doppelmutante nützlich. Außerdem könnte man

gleichzeitig den programmierten Zelltod deaktivieren, um die Zusammenhänge zwischen Autophagie, Apoptose und mitochondrialer Morphologie näher untersuchen zu können.

#### **4.6 Die mitochondriale Dynamik ist wichtig für die korrekte Vererbung der mtDNA**

Der Verlust der mitochondrialen Fusionsfähigkeit führt zur vollständigen Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes und zum Verlust der mtDNA (Merz *et al.*, 2007). Die Ursache für dieses Phänomen ist nicht geklärt. Untersuchungen zur Bewegung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass sich mitochondriale Fragmente ohne mtDNA-Nukleotide schneller bewegen als solche mit Nukleotiden (Boldogh *et al.*, 2003). Dies könnte den Verlust der mtDNA nach wenigen Generationen in der  $\Delta fzo1$ -Mutante erklären. Die in dieser Arbeit untersuchte  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Doppelmutante zeigte allerdings ebenfalls einen Verlust von mtDNA über mehrere Generationen (Abb. 3.19). Allerdings wurde die Mutante so konstruiert, dass die Mitochondrien in den Zellen nicht fragmentiert vorlagen, sondern ein wildtypisches Netzwerk bildeten (Abb. 3.15). Der Verlust der mtDNA kann in diesem Fall nicht mit den Beobachtungen von Boldogh *et al.* (2003) erklärt werden. Studien in HeLa-Zellen konnten ebenfalls zeigen, dass eine Blockierung der mitochondrialen Teilung zum Verlust von mtDNA führt, obwohl in diesem Fall das mitochondriale Netzwerk nicht fragmentiert vorliegt (Parone *et al.*, 2008). Vermutlich erfolgt der Transport von mtDNA nicht passiv bei der Vererbung der Mitochondrien, sondern aktiv innerhalb der Organellen. Dabei ist dieser Prozess wahrscheinlich mechanistisch eng mit der Regulation der mitochondrialen Morphologie verbunden. Diese These wird unterstützt durch Beobachtungen von Dimmer *et al.* (2005), wonach Form und Stabilität von mtDNA Nukleotiden abhängig von den mitochondrialen Proteinen Mdm31 und Mdm32 waren. Beide Proteine regulieren außerdem die mitochondriale Morphologie.

#### **4.7 Dynamik und Funktion der Mitochondrien sind entscheidend für die replikative Alterung von Hefezellen**

Die in dieser Arbeit untersuchte mitochondriale Fusions- und Teilungs-Doppelmutante hatte einen klaren Wachstumsdefekt in Kulturen, die aus replikativ gealterten Zellen hervorgingen (Abb. 3.17). Allerdings war nicht das Wachstum per se beeinträchtigt, sondern die Wachstumsgeschwindigkeit. Die untersuchten Kulturen befanden sich bei den Wachstumsmessungen stets in der exponentiellen Phase. Das bedeutet, dass der Anteil an jungen Zellen der ersten und zweiten Generation mehr als 99% betrug. Somit war das langsame Wachstum der Kultur aus  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutanten nicht auf den hohen Anteil an stark gealterten und möglicherweise beschädigten Zellen in der Kultur zurückzuführen. Vielmehr müssten Schäden der aufgereinigten replikativ gealterten Mutterzellen auf die jungen Tochterzellen übertragen worden sein, was sich schließlich auf deren Fitness auswirken würde. Normalerweise entstehen bei der Knospung Tochterzellen, die keine zellulären Schäden besitzen (Laun *et al.*, 2007). Das ist dahingehend erstaunlich, da Zellen mit zunehmendem Alter Schäden akkumulieren, wie es bei replikativ gealterten Hefezellen gezeigt werden konnte (Laun *et al.*, 2001; Enserink *et al.*, 2006). Für die Tatsache, dass auch gealterte Mutterzellen gesunde Tochterzellen bilden können, gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte die Verteilung des Zellmaterials von der Mutter- auf die Tochterzelle asymmetrisch erfolgen, wodurch die Tochterzelle überwiegend oder ausschließlich gesundes Zellmaterial erhält (Aguilaniu *et al.*, 2003). Zum anderen könnte das zelluläre Reparaturprogramm in der Tochterzelle stark aktiviert werden, um möglichst alle vererbten Schäden zu beseitigen (Laun *et al.*, 2007). Eine Kombination der beiden Schutzprogramme ist ebenfalls möglich. Der Grund für den Fitnessverlust der in dieser Arbeit untersuchten  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante ist unklar. Ein Versagen eines oder gar beider Schutzprogramme aufgrund des mitochondrialen Morphologiedefektes ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall die  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur grundsätzlich ein langsames Wachstum aufweisen sollte, also auch in jungen Hefekulturen, die nicht aus aufgereinigten Mutterzellen hervorgingen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die in dieser Arbeit untersuchte kontinuierlich wachsende  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Kultur hatte keinen Wachstumsdefekt bei Wachstum auf glukosehaltigem Medium (Abb. 3.17 u. 3.18). Bei den replikativ gealterten  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen wurde hingegen offensichtlich die Bildung von gesunden Tochterzellen verhindert, deren biologische Uhr wieder auf null zurückgedreht wurde. Bereits in früheren

Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich Zellzyklus und Proteinsynthese mit zunehmendem Alter der Zelle verlangsamen (Mortimer und Johnston, 1959; Motizuki und Tsurugi, 1992). Außerdem sind stark gealterte Hefezellen nicht mehr in der Lage, Tochterzellen zu bilden, deren biologische Uhr zurückgedreht wurde (Laun *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen in dieser Arbeit wäre, dass  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen schneller replikativ altern als wildtypische Hefezellen. Das würde bedeuten, dass sie entweder früher das Stadium erreichen, in dem ihr eigener Metabolismus langsam zum Erliegen kommt, oder dass ihr replikatives Höchstalter geringer ist als das wildtypischer Zellen. In beiden Fällen würden sie nach wenigen Generationen keine gesunden Tochterzellen mehr bilden können. Eine gleichzeitige Bestimmung des replikativen Höchstalters von Mutter- und Tochterzellen der  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Mutante könnte möglicherweise weitere Erkenntnisse darüber liefern, ob die entstandenen Tochterzellen tatsächlich das biologische Alter der Mutterzellen besitzen oder ob nur die in der Mutterzelle entstandenen Schäden vererbt werden.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., und Nystrom, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751-1753.

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S., und Wissinger, B. (2000). *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.

Alirol, E., James, D., Huber, D., Marchetto, A., Vergani, L., Martinou, J.C., und Scorrano, L. (2006). The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* 17, 4593-4605.

Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R.G., Seeburg, D.P., Estaquier, J., Sheng, M., und Blackstone, C. (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission und mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15, 2112-2118.

Balaban, R.S., Nemoto, S., und Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, und aging. *Cell* 120, 483-495.

Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., White, A.D., Bossy, B., Martinou, J.C., Youle, R.J., Lipton, S.A., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., und Bossy-Wetzel, E. (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 25, 3900-3911.

Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, 1-63.

Blanchard, F., Rusiniak, M.E., Sharma, K., Sun, X., Todorov, I., Castellano, M.M., Gutierrez, C., Baumann, H., und Burhans, W.C. (2002). Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals und yeast. *Mol Biol Cell* 13, 1536-1549.

Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P., und Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, und Mmm1p links mitochondrial membranes und DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* 14, 4618-4627.

Bonnefoy, N., Remacle, C., und Fox, T.D. (2007). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* und *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Methods Cell Biol* 80, 525-548.

Bradford, M.M. (1976). A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., und Shore, G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160, 1115-1127.

- Brede, Y. (2007). Biologische Bedeutung und zelluläre Mechanismen des Zelltods in *S. cerevisiae*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie, Universität Bayreuth.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Frohlich, K.U., Sigrist, S., und Madeo, F. (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life und death. *Mol Cell* 25, 233-246.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., und Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, und war. *J Cell Biol* 175, 521-525.
- Cebollero, E., und Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1413-1421.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., und Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 und Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion und are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.
- Chen, H., und Fink, G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 20, 1150-1161.
- Chen, X.J., und Butow, R.A. (2005). The organization und inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6, 815-825.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., und Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.
- Cohen, J.S., und Fox, T.D. (2001). Expression of green fluorescent protein from a recoded gene inserted into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA. *Mitochondrion* 1, 181-189.
- Cohen, M.M.J., Leboucher, G.P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H., Weissman, A.M. (2008) Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell* 19 (6), 2457-64.
- Coonrod, E.M., Karren, M.A., und Shaw, J.M. (2007). Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic* 8, 500-511.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263, 55-72.
- Cuervo, A.M., und Dice, J.F. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275, 31505-31513.
- Daum, G., Gasser, S., und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b<sub>2</sub> by isolated yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13075-13080.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., und Hamel, C.P. (2000). Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.

- Desagher, S., und Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K., und Westermann, B. (2005). Mdm31 und Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape und stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol* 168, 103-115.
- Doudican, N.A., Song, B., Shadel, G.S., und Doetsch, P.W. (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25, 5196-5204.
- Dürr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T., und Westermann, B. (2006). Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins, Mfb1 und Mdm30, in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 3745–3755
- Egner, A., Jakobs, S., und Hell, S.W. (2002). Fast 100 nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3370-3375.
- Enserink, J.M., Smolka, M.B., Zhou, H., und Kolodner, R.D. (2006). Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 175, 729-741.
- Escobar-Henriques, M., Westermann, B., und Langer, T. (2006). Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J Cell Biol* 173, 645-650.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montes- suit, S., Richter, C., Sadoul, R. *et al.* (1998). Bax- induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on  $Mg^{2+}$  ions. *J Cell Biol* 143, 217–224.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., und Mihara, K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of *FZO*, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem* 134, 333-344.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.L., Diaspro, A., Dossen, J.W., Gralla, E.B., und Longo, V.D. (2004). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 166, 1055-1067.
- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., und Longo, V.D. (2005). Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123, 655-667.
- Fabrizio, P., Liou, L.L., Moy, V.N., Diaspro, A., Valentine, J.S., Gralla, E.B., und Longo, V.D. (2003). Sod2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163, 35-46.
- Fahrenkrog, B., Sauder, U., und Aeby, U. (2004). The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J Cell Sci* 117, 115-126.
- Fannjiang, Y., Cheng, W.C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., Hill, R.B., Basanez, G., und Hardwick, J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* 18, 2785-2797.

- Fox, T.D., Sanford, J.C., und McMullin, T.W. (1988). Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7288-7292.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., und Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-525.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., und Scorrano, L. (2006). *OPA1* controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer und inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* **152**, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N., und Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 2303-2313.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., und Greenberg, E.P. (1994). *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Galan, J. M., Wiederkehr, A., Seol, J. H., Haguenaer-Tsapis, R., Deshaies, R. J., Riezman, H., und Peter, M. (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 3105–3117.
- Gorsich, S.W., und Shaw, J.M. (2004). Importance of mitochondrial dynamics during meiosis und sporulation. *Mol Biol Cell* **15**, 4369-4381.
- Gray, M.W., Burger, G., und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Griffin, E.E., Graumann, J., und Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery und recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 237-248.
- Hales, K.G., und Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121-129.
- Hall, R.M., Nagley, P., und Linnane, A.W. (1976). Biogenesis of mitochondria. XLII. Genetic analysis of the control of cellular mitochondrial DNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **145**, 169-175.
- Heath-Engel, H.M., und Shore, G.C. (2006). Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling und apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 549-560.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., und Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**, 501-507.



- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 und mitochondrial morphology depend on ATP und a functional import motor. *J Cell Biol* 165, 167-173.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology und of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278, 27781-27788.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143, 359-373.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figeys, D., und Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hoffmann, H.P., und Avers, C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* 181, 749-751.
- Honda, S., und Hirose, S. (2003). Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion und fission factors during spermatogenesis in rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 424-432.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., und O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., und Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Jacobs, H.T. (2003). The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging Cell* 2, 11-17.
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B., und Conradt, B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433, 754-760.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., und Martinou, J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278, 36373-36379.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., und Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers und promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.

- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V., und Jazwinski, S.M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span und retards aging in yeast. *FASEB J* 14, 2135-2137.
- Jürgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. & Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4997–5002.
- Kaeberlein, M., Burtner, C.R., und Kennedy, B.K. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* 3, e84.
- Kamada, Y., Sekito, T., und Ohsumi, Y. (2004). Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 73-84.
- Kanki, T., und Klionsky, D.J. (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem* 283, 32386-32393.
- Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., und Youle, R.J. (2002). Spatial und temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, und Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159, 931-938.
- Kissova, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., und Camougrand, N. (2007). Selective und non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* 3, 329-336.
- Kondo-Okamoto, N., Ohkuni, K., Kitagawa, K., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., und Okamoto, K. (2006). The novel F-box protein Mfb1p regulates mitochondrial connectivity und exhibits asymmetric localization in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 3756-3767.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., und Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., und McIntosh, J.R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116, 71-76.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., und van der Bliek, A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4, 815-826.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laun, P., Bruschi, C.V., Dickinson, J.R., Rinnerthaler, M., Heeren, G., Schwimbersky, R., Rid, R., und Breitenbach, M. (2007). Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, und the somatic mutation theory of ageing. *Nucleic Acids Res* 35, 7514-7526.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U., und Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress und apoptosis. *Mol Microbiol* 39, 1166-1173.

- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., und Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission und fusion mediators Fis1, Drp1, und Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15, 5001-5011.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress und ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366, 53-67.
- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., und Zhou, B. (2006). Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity und is involved in chronological aging. *Mol Biol Cell* 17, 1802-1811.
- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K. U. & Wolf, D. H. (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Letters* 438, 61–65.
- Ligr, M., Velten, I., Frohlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Frohlich, K.U., Wolf, D.H., und Hilt, W. (2001). The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 2422-2432.
- Lill, R., und Muhlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30, 133-141.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., und Guarente, L. (2000). Requirement of *NAD* und *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.
- Livak, K.J., und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR und the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorimer, H.E., Brewer, B.J., und Fangman, W.L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 15, 4803-4809.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., und Corte-Real, M. (2002). Cytochrome c release und mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2598-2606.
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Buttner, S., Eisenberg, T., und Kroemer, G. (2009). Caspase-dependent und caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 227-231.
- Madeo, F., Frohlich, E., und Frohlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early und late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., und Frohlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., und Frohlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., und Frohlich, K.U. (2004). Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7, 655-660.

- Manon, S., Chaudhuri, B. & Guérin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Letters* 415, 29–32.
- Martinez-Vicente, M., Sovak, G., und Cuervo, A.M. (2005). Protein degradation und aging. *Exp Gerontol* 40, 622-633.
- Masoro, E.J. (2005). Overview of caloric restriction und ageing. *Mech Ageing Dev* 126, 913-922.
- McConnell, S.J., und Yaffe, M.P. (1992). Nuclear und mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the *MDM1* protein. *J Cell Biol* 118, 385-395.
- McQuibban, G.A., Saurya, S., und Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., und Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion und crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., und Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., und Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development und life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387-1391.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M., und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W., und Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 160, 553-564.
- Mietzsch, F. (2009). Rolle der mitochondrialen Dynamik bei der Vererbung mitochondrialer DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie, Universität Bayreuth.
- Mireau, H., Arnal, N., und Fox, T.D. (2003). Expression of Barstar as a selectable marker in yeast mitochondria. *Mol Genet Genomics* 270, 1-8.
- Motz, C., Martin, H., Krimmer, T. & Rassow, J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 323, 729–738.
- Mozdy, A., McCaffery, J.M., und Shaw, J.M. (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367-379.

- Moons, P., Michiels, C.W., und Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* 35, 157-168.
- Mortimer, R.K., und Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1751-1752.
- Motizuki, M., und Tsurugi, K. (1992). The effect of aging on protein synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* 64, 235-245.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K.M., und Tansey, W.P. (2005). The F-box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover und cotranscriptional mRNA processing. *Cell* 120, 887-899.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., und Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7, 934-940.
- Neutzner, A., und Youle, R.J. (2005). Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 18598-18603.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., und Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion und fission und the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8, 1233-1242.
- Okamoto, K., Perlman, P.S., und Butow, R.A. (1998). The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J Cell Biol* 142, 613-623.
- Okamoto, K., und Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology und dynamics in yeast und multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503-536.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., und Lenaers, G. (2003). Loss of *OPA1* perturbs the mitochondrial inner membrane structure und integrity, leading to cytochrome *c* release und apoptosis. *J Biol Chem* 278, 7743-7746.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., und Martinou, J.C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function und leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3, e3257.
- Parone, P.A., und Martinou, J.C. (2006). Mitochondrial fission und apoptosis: an ongoing trial. *Biochim Biophys Acta* 1763, 522-530.
- Pavlov, E.V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E.H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S.J., Mannella, C.A., und Kinnally, K.W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells und Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155, 725-731.
- Petroski, M.D., und Deshaies, R.J., (2005). Function und regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (1), 9-20.

- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. & Lithgow, T. (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nature Struct Mol Biol* 11, 1044–1048.
- Piper, P.W., Harris, N.L., und MacLean, M. (2006). Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mech Ageing Dev* 127, 733-740.
- Powers, R.W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., und Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* 20, 174-184.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., und Severin, F.F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- und amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168, 257-269.
- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A., und Rapaport, T.A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150, 461–474.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- Reggiori, F., und Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1, 11-21.
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., und Ros, J. (2004). Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets und prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 279, 31983-31989.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., und Lombes, A. (2002). Membrane topology und mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115, 1663-1674.
- Sanjuan Szklarz, L.K., Kozjak-Pavlovic, V., Vogtle, F.N., Chacinska, A., Milenkovic, D., Vogel, S., Dürr, M., Westermann, B., Guiard, B., Martinou, J.C., Borner, C., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2007). Preprotein transport machineries of yeast mitochondrial outer membrane are not required for Bax-induced release of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* 368, 44-54.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., und Fuller, M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116, 2763-2774.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283, 1488-1493.
- Sato, A., Nakada, K., und Hayashi, J. (2006). Mitochondrial dynamics und aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim Biophys Acta* 1763, 473-481.

- Scheckhuber, C.Q., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nystrom, T., und Osiewacz, H.D. (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span und fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* 9, 99-105.
- Schulz, J.B., Bremen, D., Reed, J.C., Lommatzsch, J., Takayama, S., Wullner, U., Loschmann, P.A., Klockgether, T., und Weller, M. (1997). Cooperative interception of neuronal apoptosis by *BCL-2* und *BAG-1* expression: prevention of caspase activation und reduced production of reactive oxygen species. *J Neurochem* 69, 2075-2086.
- Sesaki, H., Dunn, C.D., Iijima, M., Shepard, K.A., Yaffe, M.P., Machamer, C.E., und Jensen, R.E. (2006). Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape und alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol* 173, 651-658.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p und Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147, 699-706.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p und Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279, 28298-28303.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E., und Jensen, R.E. (2003). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA und mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 276-283.
- Severin, F.F., und Hyman, A.A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, R233-235.
- Shukla, A., Durairaj, G., Schneider, J., Duan, Z., Shadle, T., und Bhaumik, S.R. (2009). Stimulation of mRNA export by an F-box protein, Mdm30p, *in vivo*. *J Mol Biol* 389, 238-247.
- Sickmann, A., *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R.S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors und host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26, 31-43.
- Steele, D.F., Butler, C.A., und Fox, T.D. (1996). Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5253-5257.
- Stevens, B. (1981). Mitochondrial structure. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle und inheritance*, eds. E.W. Strathern, E.W. Jones, und J.R. Broach, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 471-504.
- Sugioka, R., Shimizu, S., und Tsujimoto, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279, 52726-52734.

- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., und Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum und mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Cell Biol* 175, 901-911.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., und Shrihail, O.S. (2008a). Fission und selective fusion govern mitochondrial segregation und elimination by autophagy. *Embo J* 27, 433-446.
- Twig, G., Hyde, B., und Shrihail, O.S. (2008b). Mitochondrial fusion, fission und autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1092-1097.
- Vachova, L., und Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* 169, 711-717.
- Visser, W., van Spronsen, E.A., Nanninga, N., Pronk, J.T., Gijs Kuenen, J., und van Dijken, J.P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 243-253.
- Vittorini, S., Paradiso, C., Donati, A., Cavallini, G., Masini, M., Gori, Z., Pollera, M., und Bergamini, E. (1999). The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54, 318-323.
- Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic und degenerative diseases, aging, und cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407.
- Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., und Fahrenkrog, B. (2006). The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* und is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J Cell Sci* 119, 1843-1851.
- Weindruch, R. (1996). The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents und primates. *Toxicol Pathol* 24, 742-745.
- Westermann, B., und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Willems, A.R., Schwab, M., und Tyers, M., (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF und its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695 (1-3), 133-70.
- Williamson, D.H., und Fennell, D.J. (1975). The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting und separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol* 12, 335-351.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G., und Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 166, 969-974.



Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151, 341-352.

Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A., und Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160, 303-311.

Yorimitsu, T., und Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.

Youle, R.J., und Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 657-663.

Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., Tournev, I., Verhoeven, K., Langerhorst, C.T., de Visser, M., Baas, F., Bird, T., Timmerman, V., Shy, M., und Vance, J.M. (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 59, 276-281.

Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M., und Vance, J.M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.

## 6 ANHANG

Tab. 6.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

Nr.	Stamm	Genotyp	Plasmid	Isogen	Referenz
0	BY4743	<i>MATa/α, his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, met15/MET15, lys2/LYS2</i>			EUROSCARF
1	BY4741	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3</i>			EUROSCARF
2	$\Delta mdm30$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm30::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
3	$\Delta mfb1$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
4	BY4743-mtGFP	<i>his3::kanMX/his3::kanMX</i>	pVT100U-mtGFP	BY4743	Labor Westermann
5	$\Delta mdm30$ -mtGFP diploid	<i>mdm30::kanMX/mdm30::kanMX</i>	pVT100U-mtGFP	BY4743	Labor Westermann
6	$\Delta mfb1$ -mtGFP diploid	<i>mfb1::kanMX/mfb1::kanMX</i>	pVT100U-mtGFP	BY4743	Labor Westermann
7	<i>MFB1</i> -GFP	<i>MFB1-GFP::kanMX</i>		BY4742	(Huh <i>et al.</i> , 2003)
12	$\Delta mfb1/\Delta mdm30$	<i>mdm30::Kanr/mfb1::Kanr</i>		BY	Diese Arbeit
13	BY4741-mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, [URA3]</i>	pVT100U-mtGFP		Labor Westermann
14	$\Delta mfb1$ -mtGFP	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U-mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
15	$\Delta mdm30$ -mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U-mtGFP	BY4741	Diese Arbeit
16	$\Delta mfb1/\Delta mdm30$ -mtGFP	<i>mdm30::Kanr, mfb1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U-mtGFP	BY	Diese Arbeit
17	$\Delta mdm30$ diploid	<i>mdm30::kanMX/mdm30::kanMX</i>		BY4743	Labor Westermann
18	$mdm30$ -mtGFP diploid	<i>mdm30::kanMX/mdm30::kanMX [URA3]</i>	pVT100U-mtGFP	BY4743	Labor Westermann
20	$\Delta mdm30$ -mtRFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::Kanr, [URA3]</i>	pRSRFPGal416	BY4741	Diese Arbeit
21	$\Delta mdm30$ -mtGFP	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm30::Kanr [URA3]</i>	pYX113-mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
32	$\Delta mfb1'$	<i>MATa, his31, leu2, met15, ura3, mfb1::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF

ANHANG

33	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3</i>			EUROSCARF
40	BY4741/GAL-mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, met15, ura3, [URA3]</i>	pYX113mtGFP		Diese Arbeit
41	BY4742/GAL-mtRFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, [URA3]</i>	pRS416mtRFP		Diese Arbeit
42	$\Delta mfb1$ /GAL-mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3; leu2; met15; ura3; mfb1::KanMX4, [URA3]</i>	pYX113mtGFP	BY4741	Diese Arbeit
43	$\Delta mfb1$ /GAL-mtRFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr, [URA3]</i>	pRS416mtRFP	BY4742	Diese Arbeit
66	$\Delta mdm30/\Delta mfb1$ -mtGFP	<i>mdm30::Kanr/mfb1::Kanr mdm30::Kanr/mfb1::Kanr</i>	pVT100U-mtGFP	BY	Diese Arbeit
69	$\Delta yca1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, yca1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
70	$\Delta ydr306c$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ydr306c::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
71	$\Delta grr1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, grr1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
71	$\Delta ybr280c$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ybr280c::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
73	$\Delta cst12/amn1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, cst12/amn1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
74	$\Delta ylr097c$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ylr097c::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
75	$\Delta ufo1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ufo1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
76	$\Delta ymr258c$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ymr258c::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
77	$\Delta fcl1/dia2$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, fcl1/dia2::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
78	$\Delta ylr352w$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ylr352w::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
79	$\Delta ela1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ela1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
80	$\Delta ydr131c$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ydr131c::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
81	$\Delta ylr224w$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ylr224w::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
82	$\Delta yjl149w$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, yjl149w::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
83	$\Delta rcy1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, rcy1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF

84	<i>met30</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15,</i> <i>pMET30::kanR-tet07-TATA</i> <i>URA3::CMV-tTA</i>		R1158	Open Biosystems
85	<i>ctf13</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15,</i> <i>pCTF13::kanR-tet07-TATA</i> <i>URA3::CMV-tTA</i>		R1158	Open Biosystems
86	<i>rbx1/hrt1</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15,</i> <i>pHRT1::kanR-tet07-TATA</i> <i>URA3::CMV-tTA</i>		R1158	Open Biosystems
87	<i>cdc4</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15,</i> <i>pCDC4::kanR-tet07-TATA</i> <i>URA3::CMV-tTA</i>		R1158	Open Biosystems
88	$\Delta ufo1$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ufo1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
89	$\Delta yjl149w$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>yjl149w::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
90	$\Delta ylr097c$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr097c::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
91	$\Delta fcl1/dia2$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>fcl1/dia2::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
92	$\Delta ylr224w$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr224w::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
93	$\Delta ydr131c$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ydr131c::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
94	$\Delta rcy1$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>rcy1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
95	$\Delta ymr258c$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ymr258c::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
96	$\Delta grr1$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>grr1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
97	$\Delta ylr352w$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr352w::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
98	$\Delta ela1$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ela1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
99	$\Delta ybr280c$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ybr280c::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
100	$\Delta ydr306c$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ydr306c::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
101	$\Delta cst12/amn1$ -mtGFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>cst12/amn1::Kanr, [URA3]</i>	pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
106	<i>ctf13</i> -mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15,</i> <i>pCTF13::kanR-tet07-TATA</i> <i>URA3::CMV-tTA, [LEU2]</i>	pYX142-mtGFP	R1158	Diese Arbeit

ANHANG

107	<i>met30</i> -mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, pMET30::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA, [LEU2]</i>	pYX142-mtGFP	R1158	Diese Arbeit
108	<i>rbx1/hrt1</i> -mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, pHRT1::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA, [LEU2]</i>	pYX142-mtGFP	R1158	Diese Arbeit
109	<i>cdc4</i> -mtGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, pCDC4::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA, [LEU2]</i>	pYX142-mtGFP	R1158	Diese Arbeit
111	BY4741-erGFP	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, [URA3]</i>	WP1055-erGFP		Diese Arbeit
124	$\Delta mfb1$ -mtGFP*	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2 pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
125	$\Delta mfb1$ -mtGFP*	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2-MFB1 pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
126	$\Delta mfb1$ -mtGFP*	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mfb1::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2- MFB1- $\Delta$ fbx pVT100U- mtGFP	BY4742	Diese Arbeit
127	$\Delta mdm30$ -mtGFP*	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2 pVT100U- mtGFP	BY4741	Diese Arbeit
128	$\Delta mdm30$ -mtGFP*	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2- MDM30 pVT100U- mtGFP	BY4741	Diese Arbeit
129	$\Delta mdm30$ -mtGFP*	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::Kanr, [URA3, LEU2]</i>	pJDCEX2- MDM30- $\Delta$ fbx pVT100U- mtGFP	BY4741	Diese Arbeit
132	BY4741-MFB1	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, [LEU2]</i>	pJDCEX2-MFB1		Diese Arbeit
133	BY4741-MDM30	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, [LEU2]</i>	pJDCEX2- MDM30		Diese Arbeit
137	W303A	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3</i>			EUROSCARF
142	BY4742-YCA1	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, [HIS3]</i>	pRS313-YCA1		Diese Arbeit
143	BY4742-pRS313	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, [HIS3]</i>	pRS313		Diese Arbeit
144	$\Delta yca1$ -pRS313	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, yca1::Kanr, [HIS3]</i>	pRS313	BY4742	Diese Arbeit
148	$\Delta mgm1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mgm1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF

# ANHANG

149	$\Delta fzo1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, fzo1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
151	$\Delta dnm1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, dnm1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
156	BY-YCA1-GFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, met15, ura3, [LEU2]</i>	pRS425-YCA1-GFP	BY4741	Diese Arbeit
157	YPH500 (WT)	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i>			(Sikorski und Hieter, 1989)
158	$\Delta fzo1$ -a	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr</i>		YPH499	(Rapaport <i>et al.</i> , 1998)
160	FZO1 WT	<i>Mat a, ura3<math>\Delta</math>52, his3<math>\Delta</math>200, leu2<math>\Delta</math>1, trp1<math>\Delta</math>63, [LYS2]</i>		JSY1823	(Hermann <i>et al.</i> , 1998)
161	$\Delta fzo1$ (YKSD018)	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::HIS3</i>		YPH500	Kai Dimmer, Universität München
162	$\Delta dnm1$ (YKSD017)	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, dnm1::HIS3</i>		YPH500	Kai Dimmer, Universität München
151	$\Delta mip1$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, mip1::Kanr</i>		BY4742	EUROSCARF
164	WT (YPH499)	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i>			(Sikorski und Hieter, 1989)
168	YPH500-Abf2-GFP	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, [URA3]</i>	pYES-Abf2-GFP		Diese Arbeit
169	YPH500- Abf2-DsRed	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, [URA3]</i>	pYES-Abf2-DsRed		Diese Arbeit
179	$\Delta fzo1/\Delta dnm1a$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, fzo1::Kanr, dnm1::Kanr, rho<sup>+</sup></i>		BY-Hintergrund	Diese Arbeit
180	$\Delta fzo1/\Delta dnm1\alpha$	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, fzo1::Kanr, dnm1::Kanr, rho<sup>+</sup></i>		BY-Hintergrund	Diese Arbeit
183	YMD04 ( $\Delta fzo1/\Delta dnm1\alpha$ rho <sup>0</sup> )	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr, dnm1::HIS3, rho<sup>0</sup></i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
184	YMD11 ( $\Delta fzo1/\Delta dnm1a$ rho <sup>0</sup> )	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr, dnm1::HIS3, rho<sup>0</sup></i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
185	YMD12 ( $\Delta fzo1/\Delta dnm1a$ rho <sup>+</sup> )	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr, dnm1::HIS3, rho<sup>+</sup></i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
186	YPH500 rho <sup>0</sup>	<i>Mat <math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, rho<sup>0</sup></i>			Diese Arbeit

ANHANG

187	YPH499 rho <sup>0</sup>	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, rho<sup>0</sup></i>			Diese Arbeit
193	WT-DsRed	<i>Mat α, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, rho<sup>+</sup></i>	pHS12-DsRed.T3	YPH500	Diese Arbeit
194	Δfzo1/Δdnm1-DsRed	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr, dnm1::HIS3, rho<sup>+</sup></i>	pHS12-DsRed.T3	YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
195	Δfzo1-mtGFP	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanr</i>	pVT100U-mtGFP	YPH499	Diese Arbeit
196	Δdnm1-DsRed	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, dnm1::HIS3</i>	pHS12-DsRed.T3	YPH500	Diese Arbeit
197	Δfzo1a	<i>MATa, his3, leu2, met2, ura3, fzo1::Kanr</i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
198	Δfzo1α	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, fzo1::Kanr</i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
199	Δdnm1a	<i>MATa, his3, leu2, met2, ura3, dnm1::Kanr</i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
200	Δdnm1α	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, dnm1::Kanr</i>		YPH-Hintergrund	Diese Arbeit
216	Δdnm1 rho <sup>0</sup>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, dnm1::Kanr</i>		BY4741	Diese Arbeit

## Publikationsliste

### Im Rahmen der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Dürr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T., und Westermann, B. (2006). Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins, Mfb1 und Mdm30, in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 3745–3755.

Sanjuan Szklarz, L.K., Kozjak-Pavlovic, V., Vogtle, F.N., Chacinska, A., Milenkovic, D., Vogel, S., Durr, M., Westermann, B., Guiard, B., Martinou, J.C., Borner, C., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2007). Preprotein transport machineries of yeast mitochondrial outer membrane are not required for Bax-induced release of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* 368, 44-54.

Altmann, K., Dürr, M. und Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology – general considerations und basic procedures. *Methods Mol Biol* 372, 81-90 (Review).

Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M., und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926. (Review).



Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.



---

Mark Dürr

Neuhaus, den 19. Januar 2011